

**Untersuchungen zur Hodenhistologie, Spermatogenese
sowie Spermien- und Erythrozytengröße bei
diploiden und triploiden Wasserfröschen.**

Diplomarbeit

an der Formal- und Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Wien

zur Erlangung des Grades

Magister der Naturwissenschaften

eingereicht von Helmut Dollfuß

Wien, am 3. 9. 1997

*"Fressen und Gefressen werden",
eine zu meinem Leidwesen nur allzu
populäre, stark vereinfachende Aussage, über
die Beziehungen zwischen Lebewesen, sollte
ersetzt werden durch ein wohl zeitgemäßeres,
aus der Ökologie ableitbares
"Tragen und Getragen werden".*

Danksagung

Bei der Ausführung meiner Diplomarbeit wurde ich von vielen Menschen getragen, denen ich hiermit herzlich danken will, mit der Hoffnung, in der einen oder anderen Weise etwas für Ihr Leben beigetragen zu haben.

Herrn Prof. Heinz Tunner, dem Betreuer dieser wissenschaftlichen Arbeit möchte ich für das herausfordernde Thema, für den Arbeitsplatz in seiner Wasserfroschgruppe und für klärende Diskussionen danken. Durch Mitarbeit an anderen Schwerpunkten des von ihm geleiteten Forschungsprojektes, ergab sich die Gelegenheit diese interessanten Tiere nicht nur "scheibchenweise" kennenzulernen.

Ein besonderer Dank gebührt meiner Familie. Meinen Eltern und meinen Taufpaten die mich mit finanziellen Mitteln, mit Interesse und mit unvergleichlicher Geduld viele Jahre getragen haben, meinem Bruder für lange ausgeborgtes Mikroskopie- und Fotographiezubehör sowie für wertvolle Praxistips, meinen Schwestern Elfriede und Annemarie die nicht nur durch kulinarische Köstlichkeiten meinen Studentenalltag aufhellten und natürlich meiner Lebensgefährtin Angelika, mit der ich so manches Problem meiner Diplomarbeit fachlich diskutieren konnte und die mich bei Motivationseinbrüchen ge- und ertragen hat.

Mein Freund Leo Schweighofer rettete mich mehrmals aus unerträglicher Situation, die der Einsatz moderner Computertechnik mit sich bringt.

Den Kollegen Elke Lebeth und Max Hable danke ich für ihren Beitrag zur Überprüfung und Erarbeitung von Daten zur Größe von Froschpermien und Erythrozyten, im Rahmen eines Wasserfroschpraktikums.

Große Teile der praktischen Arbeit konnte ich nur an anderen Abteilungen des Institutes für Zoologie durchführen. Ich danke Frau Prof. Klepal und Herrn Prof. Hilgers für ihre freundliche und ausdauernde Unterstützung, sowie ihren Mitarbeitern für die entgegenkommende Zusammenarbeit und Einschulung an technischen Geräten.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1 Die "Wasserfroschproblematik"	4
1.2 Triploide Teichfrösche	7
1.3 Triploide Kleine Wasserfrösche	8
1.4 Spermatogenese bei Wasserfröschen	9
1.5 Jahreszeitliche Dynamik der Spermatogenese	11
1.6 Untersuchungsziele	12
2. Material und Methode	13
2.1 Die untersuchten Tiere	13
2.2 Herstellung der Hodenschnitte	16
2.3 Zeichnen der Hodenquerschnitte, Bestimmung der Querschnittsfläche und der Tubulusanschnittsflächen	18
2.4 Histologische Auswertungen	19
2.5 Präparation und Vermessung der Spermien	19
2.6 Präparation und Vermessung der roten Blutkörperchen	21
3. Ergebnisse	22
3.1 Größe der Erythrozyten	22
3.2 Hodenhistologie, Hodengröße	25
3.3 Häufigkeit der Spermatogenesestadien	37
3.4 Größe der Spermien	41
4. Diskussion	48
4.1 Die Größe der Erythrozyten	48
4.2 Hodenhistologie	49
4.3 Hodenquerschnittsfläche und Kopf-Rumpf Länge	52
4.4 Die Häufigkeit der Spermatogenesestadien	56
4.5 Die Größe der Spermien	56
5. Zusammenfassung	61
Literatur	62
Bildanhang	69

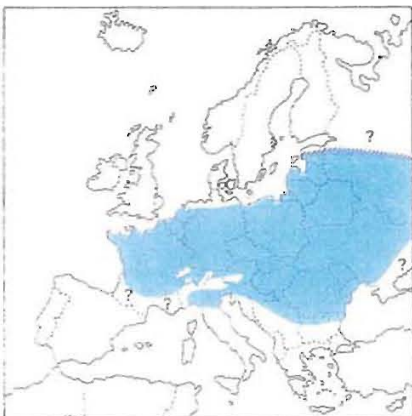
1. Einleitung

1.1 Die "Wasserfroschproblematik"

Zu den mitteleuropäischen Wasserfröschen zählt der Seefrosch *Rana ridibunda*, der Kleine Wasserfrosch *Rana lessonae* und der Teichfrosch *Rana esculenta*. Vertreter dieser Gruppe halten sich auch außerhalb der Fortpflanzungszeit im Wasser oder in dessen unmittelbarer Nähe auf. Wegen ihrer Körperfärbung werden sie auch als Grünfrösche bezeichnet.



R. ridibunda
Weibchen



R. lessonae
Männchen



R. esculenta
Männchen

Abb. 1: Die drei mitteleuropäischen Wasserfrösche: Der Seefrosch *Rana ridibunda*, der Kleine Wasserfrosch *Rana lessonae* und der Teichfrosch *Rana esculenta*. Die Verbreitung des Teichfrosches deckt sich überwiegend mit dem Fundgebiet des Kleinen Wasserfrosches während der Seefrosch sein Hauptvorkommen im Osten aufweist.
(aus Nöllert & Nöllert, 1992: Die Amphibien Europas)

In dieser Froschgruppe kommt nun der unter Wirbeltieren seltene Fall von sich erfolgreich fortpflanzenden Arthybriden vor. Der polnische Zoologe Leszek Berger wies 1968 nach umfangreichen Kreuzungsexperimenten und morphometrischen Analysen erstmals darauf hin, daß der lange als "gute Art" angesehene und in der Forschung vielfach verwendete Teichfrosch *R.esculenta* ein Bastard ist, der aus der Paarung des Seefrosches *R.ridibunda* mit dem Kleinen Wasserfrosch *R.lessonae* hervorgeht. Das war der Angelpunkt in der Erforschung der bis dahin unklaren Taxonomie dieser Tiergruppe. Blankenhorn et.al. (1971) und Günther (1973) konnten die zuerst angezweifelte Ergebnisse Bergers unterstützen. Die elektrophoretische Analyse von Serumproteinen durch Tunner (1970, 1972, 1973, 1979) und Engelmann (1972, 1973) bestätigte dann überzeugend den Hybridcharakter von '*R. esculenta*'.

Chromosomenuntersuchungen an diesen Wasserfröschen ergaben Karyotypen die sich in ihrer Grobmorphologie weitestgehend glichen. Erst die C-Bandtechnik und weitere Bänderungsmethoden die konstitutives Heterochromatin selektiv anfärben, ließen artspezifische Unterschiede erkennen. Dies ermöglichte Einblicke in das zytologische "make-up" der Wasserfrösche und den Nachweis des Hybridcharakters auch auf zytologischer Ebene (Heppich, 1978, 1980).

Verschiedenste Kreuzungen von und mit Wasserfröschen aus anderen europäischen Populationen ergaben jedoch widersprüchliche Resultate. Bald erkannte man, daß sich hinter '*R.esculenta*' unterschiedliche Genotypen mit einem sehr speziellen Vererbungsmodus verbergen (Günther & Plötner, 1988). Dieser Hybrid lebt zumeist syntop mit nur einer Elternart, *R.lessonae* (L-E System nach Uzzell & Berger, 1975), zusammen. Aus den regelmäßigen heterotypischen Paarungen, dh. Rückkreuzungen mit *R.lessonae*, gehen allerdings meist wiederum Nachkommen mit typischen *esculenta*-Phänotyp hervor. Aus homotypischen Paarungen von '*R.esculenta*' entstanden aber nur vereinzelt lebensfähige Frösche die überwiegend den *ridibunda*-Phänotyp aufwiesen. Für diese ungewöhnliche Abweichungen vom normalen Vererbungsgang nahm man eine selektive Weitergabe des *ridibunda*-Genoms durch den Hybriden an, ohne Rekombination mit dem *lessonae*-Genom während der Gametogenese (Zusammenfassung in Günther, 1990).

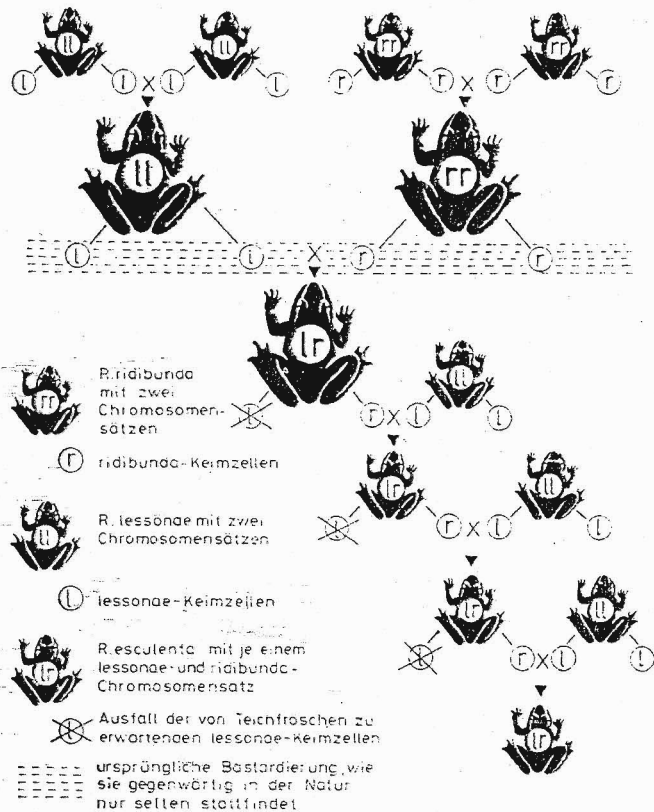


Abb. 2: Vorherrschender Vererbungsmodus in einer Froschpopulation, bestehend aus *R. lessonae* und '*R. esculenta*'. Das *lessonae*-Genom des Artbastarden '*R. esculenta*' wird noch vor der Meiose aus der Keimbahn eliminiert und der verbleibende *ridibunda*-Chromosomensatz verdoppelt. Während der Gametogenese produziert der Hybrid haploide *ridibunda*-Gameten. Die regelmäßige Rückkreuzung mit der Elternart *R. lessonae* bringt darum wiederum Hybriden mit F1-Phänotyp hervor (Schema nach Günther R. & Senglaub K., 1978).

Tunner (1974) schlug vor, das Fortpflanzungssystem des Teichfrosches als Hybridogenese im Sinne von Schulz (1969) anzusehen, der einen solchen Vererbungsmechanismus bei mexikanischen Zahnkarpfen der Gattung *Poeciliopsis* beschrieben hatte. Der von Cimino (1972) für die von Schulz beschriebenen Karpfen angegebene zytologische Mechanismus für deren klonale Vererbung, nämlich die Ausbildung von nur einer Halbspindel während der Meiose und die chemische Unverträglichkeit von väterlichem Spindelorganisator und Ooplasma, konnte bei den Wasserfröschen nicht nachgewiesen werden. Vielmehr scheint das *lessonae*-Genom in der Keimbahn des Hybriden schon früh in der Ontogenese, also noch vor der Meiose verloren zu gehen und durch Verdopplung der verbleibenden *ridibunda*-Chromosomen ersetzt zu werden (Tunner 1980, Tunner & Heppich 1981 und 1991, Heppich et al. 1982).

Die dadurch weitgehend unveränderte, klonale Weitergabe des *ridibunda*-Gensatzes bei der Rückkreuzung mit der syntopen Elternart *R. lessonae* sichert also den Fortbestand der F1-Phänotypen. Aus solchen Paarungen gehen sowohl Weibchen als auch Männchen hervor, im Gegensatz zu anderen Vertebraten mit klonalem Vererbungsmechanismus (Graf & Polls-Pelaz 1989).

Da '*R. esculenta*' nun der Artstatus abhanden gekommen war schlugen Dubois & Günther (1982), aufgrund der angeführten Erkenntnisse, vor, den wissenschaftlichen Namen des Teichfrosches auf *Rana* klepton *esculenta* abzuändern. Der Hybrid wird als Klepton bezeichnet der Gene von der Elternart "stiehlt".

Derzeit werden in Europa 8 Populationssysteme unterschieden, in denen der Teichfrosch mit dem Kleinen Wasserfrosch oder, seltener, mit dem Seefrosch zusammenlebt (in diese Fällen verliert der Hybrid das *ridibunda*-Genom) und sich durch Rückkreuzung erhält. In einigen untersuchten Populationen gehen jedoch aus homotypischen Teichfroschpaarungen sehr wohl auch wieder Nachkommen der gleichen Form hervor. Der Hybrid scheint sich also mancherorts genetisch stabilisiert zu haben (Günther, 1973).

1.2 Triploide Teichfrösche

Triploide Larven von *R.kl.esculenta* wurden erstmals von Hertwig & Hertwig (1920) beschrieben. Bedingt durch die damals noch unzureichende Untersuchungstechnik konnte man die Chromosomenzahl nicht genau angeben. Wickbom veröffentlichte 1945 den Fund von drei adulten *R.kl.esculenta* auf der Insel Bornholm (Dänemark). Bei der Erstellung von Wasserfroschkaryotypen fand Günther (1970) unter 24 Individuen des Teichfrosches 7 triploide Exemplare (5 männlich und 2 weiblich). Sie besaßen 39 Chromosomen ($3n$), häufig konnte er aber auch aneuploide Zellen feststellen. Weiters fand er bei den Hybriden übernormal große Spermien bei denen er als Ursache einen erhöhten Chromosomensatz vermutete.

Triploide Hybriden können speziell in reinen *R.kl.esculenta* Populationen einen sehr hohen Anteil ausmachen (bis ca. 80%). Basierend auf ihrer genetischen Konstitution unterscheidet man die zwei Typen RRL (zwei *ridibunda*- plus ein *lessonae*-Chromosomensatz) und RLL (ein *ridibunda*- plus zwei *lessonae*-Chromosomensätze). Für die Entstehung solcher allotriploider Frösche sind mehrere Wege denkbar die man auch in verschiedenen Populationen Europas nachweisen konnte:

- Weibliche *R.kl.esculenta* aus L-E Populationen produzieren Eier in drei Größenklassen. Die Anzahl der größten macht etwa 1% aus. Diese besitzen den diploiden Gensatz RL und bei der Befruchtung dieser Eier durch ein Spermium mit haploiden *ridibunda*- bzw. *lessonae*- Chromosomensatz entstehen die beiden erwähnten triploiden Typen (Berger et al., 1978b).

- In selteneren Fällen enthalten große Eier von *R.kl.esculenta* einen RR-Chromosomensatz der bei der Befruchtung mit einem haploiden *lessonae*-Spermium einen RRL Typ ergibt (Berger et al., 1986).
- Eine L-E Wasserfroschpopulation in Frankreich enthält 19% RLL Typen die ausschließlich männliches Geschlecht besitzen. Diese produzieren diploide LL-Spermien die bei der Kreuzung mit *R.kl.esculenta* Weibchen wiederum nur männliche Triploide erzeugen (Polls Pelaz, 1991; zitiert aus Polls Pelaz, 1994).
- In einer R-E Froschpopulation in Ungarn fand man neben Seefröschen beiderlei Geschlechts triploide Teichfroschmännchen des genetischen Typs RLL. Kreuzungsversuche zeigten, daß diese triploiden Männchen LL-Gameten produzieren, die bei der Kreuzung mit diploiden *R.kl.esculenta*, aber auch mit *R.ridibunda*, wiederum triploide Teichfroschmännchen erzeugen (Tunner & Heppich-Tunner, 1991a und 1992; Heppich-Tunner & Tunner, 1991).
- Triploide Tiere produzieren haploide Gameten bei deren Entstehung derjenige Gensatz der in der Einzahl ist eliminiert wird (RRL → R-Gameten bzw. RLL → L-Gameten). In reinen E-Populationen können RLL-Frösche einen hohen Anteil haben und durch die Erzeugung haploider L-Gameten die ansonsten nötige Elternart *R. lessonae* "ersetzen". Aus der Kreuzung von triploiden mit diploiden *R.kl.esculenta* gehen somit wiederum der Hybrid (RL) aber auch triploide Tiere (RLL) hervor.

1.3 Triploide Kleine Wasserfrösche

Im Rahmen des von Prof. Tunner geleiteten Forschungsprojektes PO951-Bio (FWF) bestand auch die Gelegenheit triploide Nachkommen mit dem genetischen Typ LLL (drei *lessonae*-Chromosomensätze), aus künstlichen Kreuzungen, zu untersuchen. Die Zucht dieser Tiere wurde von mehreren Wasserfroschforschern angestrebt, gelang aber bisher nur Tunner, erstmalig im Jahre 1990. Die Paarung von männlichen triploiden *R.kl.esculenta* (LLR) mit weiblichen *R. lessonae* (LL) ergab triploide *R. lessonae* Nachkommen (LLL) mit ausschließlich männlichem Geschlecht. Ein großer Teil davon starb bereits im Larvenstadium (Tunner, pers.).

1.4 Spermatogenese bei Wasserfröschen

Histologische Untersuchungen an Anurenhoden datieren bis ins vorige Jahrhundert zurück. St.George von la Valette (1876) führte mit seiner Arbeit "Über die Genese der Samenkörper" bereits Bezeichnungen für einzelne Spermatogenesestadien ein, die auch heute noch in Gebrauch sind.

Bedeutete früher Spermatogenese, einfach ausgedrückt, die Entwicklung von Spermien, so hat sich durch die Zunahme der ökologisch orientierten Sichtweise in vielen Fachgebieten die Blickweise auf diesen Vorgang verändert.

Man versteht nun darunter die Entwicklungsgeschichte einer bestimmten Zellpopulation, die durch Wechselwirkung untrennbar an seine Umgebung gebunden ist (Roosen-Runge, 1977). Darin spiegelt sich die Erkenntnis wider, daß männliche Keimzellen nie alleine heranwachsen, sondern meist in syncytialen Verbänden, zusammen mit somatischen Zellen. Bereits früh in der Ontogenie wird dieses Aggregat aus Keim- und Körperzellen separiert, wobei letztere die unmittelbare Umgebung (Cysten, Samenkanälchen, Hoden) für den späteren Prozeß der Spermatogenese bilden.

Der ausdifferenzierte Hoden der Wasserfrösche setzt sich zusammen aus Samenkanälchen (Tubuli) die in einem Gewebe, bestehend aus Blutgefäßen, Hormonzellen, Samenabflußkanälchen (Rete testis) und Verbindungsgewebe eingebettet sind. Das Innere der Samenkanälchen ist mit der Keimzellenschicht ausgekleidet die in Kompartimente (Cysten) unterteilt ist. Somit vollzieht sich der gesamte Vorgang der Spermatogenese innerhalb von Umhüllungen (Cysten) die von den sogenannten Follikelzellen somatischen Ursprungs gebildet werden. Diese Umhüllungszellen werden mit den Sertolizellen der Säugetiere homologisiert und erfüllen auch ähnliche Aufgaben während der Spermienreifung. Die histologischen Charakteristika der spermatogenetischen Stadien sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt. Sie basieren auf Untersuchungen an *Rana temporaria*, haben aber auch für Wasserfrösche volle Gültigkeit.

Abb. 4: Histologische Charakteristika der im Hodenquerschnitt aufscheinenden Spermatogenesestadien (nach van Oordt, 1956; Roosen-Runge, 1977; Witschi 1924; zusammengefaßt).

Stadium			Generelles Aussehen	Kern u. Nukleoli
a) Vermehrungs- stadium	Primäre Spermatogonien	SPG I	auffallend große Zellen, die an der Wand des Samenkanälchens liegen, von einer oder mehreren Follikelzellen umgeben	unregelmäßig geformter Kern, meist 2 auffallend große Nukleoli vorhanden
	Sekundäre Spermatogonien	SPG II	rundliche Zellen, die bei jedem Teilungsschritt kleiner werden, geringer werdender Cytoplasmaanteil relativ zum Kernanteil, bis zu 8 Zellteilungen dh. mehr als 200 Zellen in einer Cyste am Ende der Vermehrungsphase, Cyste verbleibt an der Tubuluswand	Kern wird streng sphärisch und bei jedem Teilungsschritt geringfügig kleiner
b) Reifungs- stadium	Primäre Spermatozyten	SPC I	vorausgehende Wachstumsphase der Zellen, Cyste dehnt sich zum Tubuluslumen hin aus	Zellkerne werden wieder annähernd so groß wie bei SPG I, verschiedene Stadien der 1. meiotischen Teilung sichtbar, Nucleoli verschwinden
	Sekundäre Spermatozyten	SPC II	deutlich kleinere Zellen, die entlang der Cystenwand konzentriert sind ("Blase" bis "Hohlblase" im Querschnitt)	einzelne Stadien der 2. Reifeteilung kaum sichtbar
c) Spermatiden- stufe	Spermatiden	SPT	kleine, rundliche Zellen an der Cystenwand konzentriert ("Hohlblase" im Querschnitt)	dichter, rundlicher Kern
d) Spermio- genese	Spermien	SP	Hohlblase öffnet sich zum Tubulusvolumen hin, Bündel von Spermien bleiben mit je einer Follikelzelle verbunden	Kern wird stabförmig

Auf Fertilitätsschwächen bei diploiden und triploiden männlichen Hybriden *R.kl.esculenta* wiesen Günther (1970, 1973, 1979) sowie Blankenhorn et al. (1971), Stadelmayer (1976) und Tunner (1980)) in mehreren Veröffentlichungen hin. Unterschiedlich große oder deutlich verkleinerte und deformierte Hoden und Störungen im Ablauf der Spermatogenese wurden angegeben. Histologische Untersuchungen der Hodenstruktur zeigten auffallend vergrößerte Querschnitte der Hodentubuli verglichen mit den Elternarten. Weiters werden "Blockierungen" im Spermatogeneseablauf, verminderte Spermienzahl und eine "allgemeine Desorganisation" des Hodengewebes beschrieben.

Diese Störungen treten jedoch nicht bei allen Individuen und in allen Verbreitungsgebieten von *R.kl.esculenta* gleichermaßen auf, wie Günther (1973) selbst feststellte.

Die von Freitag (1982) angegebenen Befunde einer vergleichenden histologischen Studie an Wasserfröschen des Neusiedler Sees decken sich mit denen von Günther, sind aber nicht mit entsprechenden quantitativen Daten aus vergleichenden Messungen belegt.

1.5 Jahreszeitliche Dynamik der Spermatogenese

Wasserfrösche haben einen stark saisonal geprägten Lebensverlauf der sich auch im jahreszeitlichen Ablauf der Spermatogenese widerspiegelt. Die Zyklik ist durch das jeweilige Klima geprägt wie für *R.kl.esculenta* nachgewiesen wurde (Rastogi et al., 1976). Tiere derselben Art aus verschiedenen geographischen Regionen zeigen daher auch Unterschiede im zeitlichen Heranreifen der Gameten. Die Hauptfortpflanzungszeit der Wasserfrösche liegt nach Günther (1990) im Mai, ist jedoch je nach Witterungsverhältnissen variabel und im südlichen Verbreitungsgebiet generell früher zu erwarten. Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über den jahreszeitlichen Verlauf und die Häufigkeit der Spermatogenesestadien bei *R.kl.esculenta* aus der Umgebung Neapels.

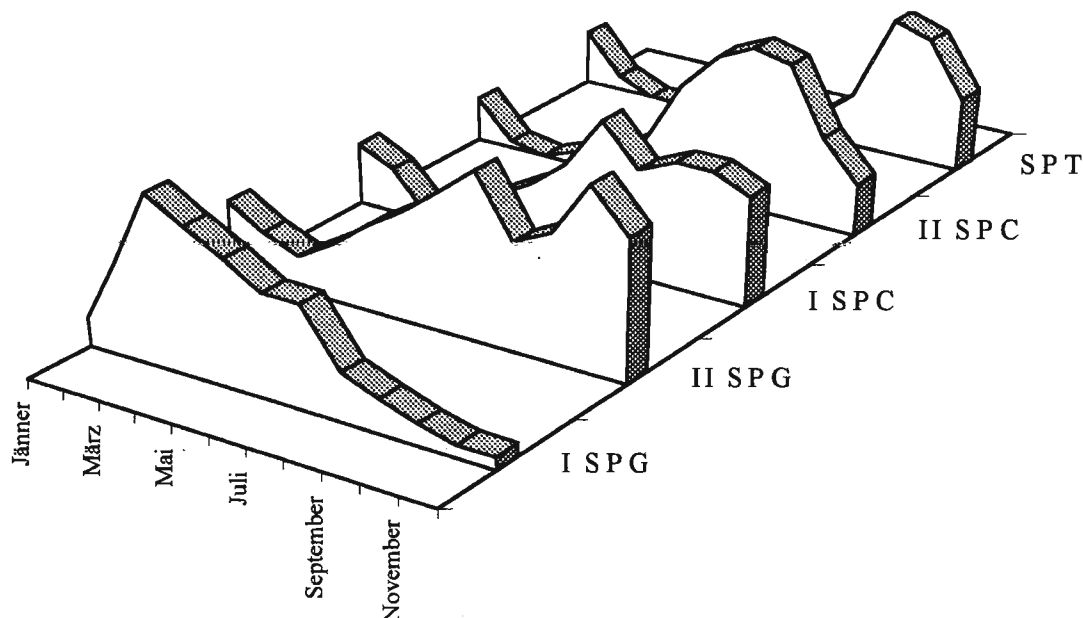


Abb. 5: Jahreszeitlicher Verlauf und Häufigkeit der Spermatogenesestadien bei *R.kl.esculenta* aus der Umgebung Neapels. Über eine Saison betrachtet läuft eine Spermatogenesewelle durch, die nach Abgabe der Spermien während der Fortpflanzungszeit gestartet wird (Daten aus Rastogi et al., 1976).

Der gesamte Vorgang der Spermatogenese beansprucht bei *R.kl.esculenta* unter konstanten Laborbedingungen 41 Tage wovon bemerkenswerter Weise 26 Tage (63%) auf Stadien der meiotischen Prophase (primäre Spermatozyten, SPC I) entfallen (Rastogi et al., 1976). Im Freiland sind dementsprechend andere Zeiten zu erwarten wie ein Blick auf den obigen Verlauf der jahreszeitlichen Dynamik zeigt.

1.6 Untersuchungsziele

- a) Ausarbeitung einer Methode, vorzugsweise einer Semidünnschnittechnik, und einer geeigneten Färbung zur histologischen Untersuchung von Wasserfroschhoden die bessere Ergebnisse liefert als vorliegende Schnittserien.
- b) Dokumentation und Vergleich der im Schnittbild sichtbaren Hodenstrukturen und Spermatogenesestadien von *R.ridibunda* und diploiden sowie triploiden *R.lessonae* und *R.kl.esculenta*.
- c) Erarbeitung einer geeigneten Methode zur Größenvermessung von Wasserfroschspermien und deren vergleichende Messung bei den oben angeführten Taxa.
- d) Messung der Erythrozytenfläche der untersuchten Tiere zur Kontrolle ihrer Ploidiestufe.

2. Material und Methode

2.1 Die untersuchten Tiere

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tiere stammen aus künstlichen Kreuzungen (durchgeführt von Prof. Tunner) und aus verschiedenen, bereits gut untersuchten Wasserfroschpopulationen, östlich von Wien.

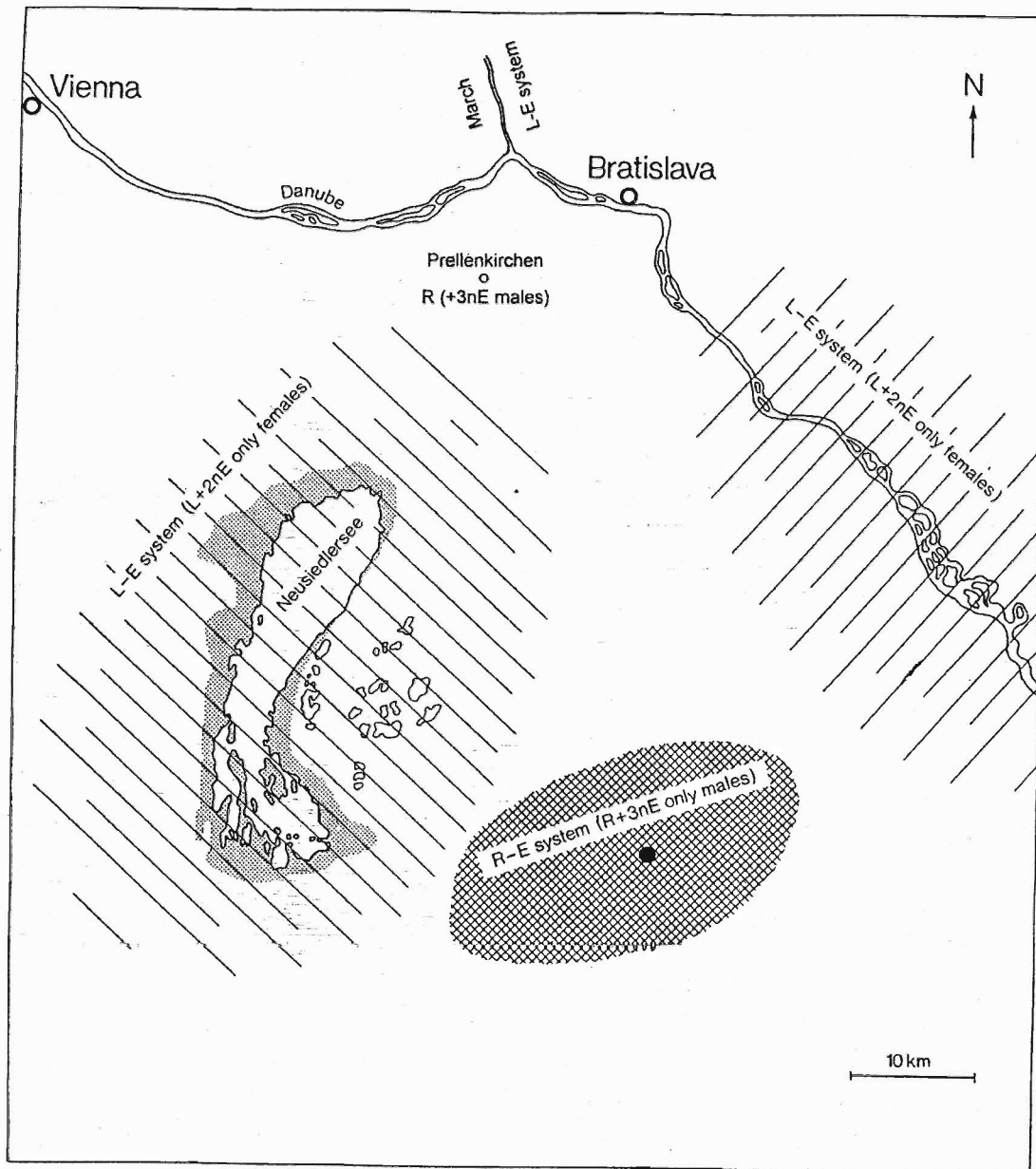


Abb. 6: Die geographische Lage der Wasserfroschpopulationen östlich von Wien. Zwischen den beiden L-E Systemen am Neusiedlersee und an der Donau, unterhalb von Bratislava, in denen neben dem Kleinen Wasserfrosch nur weibliche Teichfrösche vorkommen, liegt ein R-E System, das nur Seefrösche und männliche triploide Teichfrösche aufweist. Die Population bei Prellkirchen besteht aus Seefröschen, in die gelegentlich triploide Teichfroschmännchen einwandern. Im Süden des Marchflusses herrscht wiederum ein L-E System vor in dem aber Teichfrösche beiderlei Geschlechts zu finden sind (Zeichnung aus Tunner & Heppich-Tunner, 1991a; ergänzt nach Angaben aus Brychta, 1994 und Welzl, 1994).

Die in dieser Arbeit verwendeten Wasserfrösche aus dem Sammlungsmaterial von Prof. Tunner, wurden bereits morphologisch, elektrophoretisch, cytologisch und auch durchflußzytometrisch genau untersucht. Eine Zuordnung der Tiere zum jeweiligen Taxon, basierend auf diesen Ergebnissen, war ebenfalls bereits vorgenommen worden.

Im Folgenden sind alle Frösche aufgelistet die in einer der nachfolgenden Untersuchungen verwendet wurden.

Abb. 7: Tabelle aller Wasserfrösche, die in einer der nachfolgenden Untersuchungen verwendet wurden. Die angegebene Tiernummer bezeichnet die fortlaufende Sammlungsnummer. Die Kopf-Rumpf Länge (KRL) soll einen ungefähren Anhaltspunkt über das Alter der Tiere geben. Daneben ist noch angegeben für welche Untersuchung das jeweilige Tier verwendet wurde (Hist.: Histologie; Eryt.: Erythrozytengröße; Sperm.: Spermengröße). Alle hier angeführten Tiere stammen aus dem Sammlungsmaterial von Prof. Tunner. Sie wurden bereits morphologisch, elektrophoretisch, cytologisch und auch durchflußzytometrisch genau untersucht. Eine Zuordnung der Tiere zum jeweiligen Taxon, basierend auf diesen Ergebnissen, war bereits vorgenommen worden.

Tier Nr.	gen. Typ	Herkunft Population	Sammlung und Präparation	KRL [mm]	Hist. Eryt. Sperm		
104	LLL	Terrarium, (Kreuzung L2xT2)	gesammelt: 2. 10. 94 präpariert: 12. 10. 94	54,9	x	x	x
105	LLL	Terrarium (Kreuzung L2xT2)	gesammelt: 2. 10. 94 präpariert: 12. 10. 94	52	x	x	x
106	LLL	Terrarium (Kreuzung L1xT1)	gesammelt: 2. 10. 94 präpariert: 12. 10. 94	53	x	x	x
107	LLR	Terrarium (Kreuzung E1xT2)	gesammelt: 2. 10. 94 präpariert: 12. 10. 94	59,3	x	x	x
108	LLR	Terrarium (Kreuzung E1xT2)	gesammelt: 2. 10. 94 präpariert: 12. 10. 94	57,9	x	x	x
1180	LLR (T3)	R+3nE nur männl.	präpariert: 1. 6. 90	66	x	x	x
1181	LLR (T4)	R+3nE nur männl.	präpariert: 1. 6. 90	63,6	x	x	x
1125	RR	Prellenkirchen R (+3nE)	gesammelt: 17.4. 90 präpariert: 18.4. 90	83,3		x	x
1126	RR	Prellenkirchen R (+3nE)	gesammelt: 17.4. 90 präpariert: 18.4. 90	84,9		x	x
1610	RR	Földsziget	gesammelt: 26. 5. 94 präpariert: 31. 5. 94	69			x

1619	RR	Bulgarien	präpariert: 1. 6. 94	69			x
1631	RR	Prellenkirchen R (+3nE)	gesammelt: 11. 6. 94 präpariert: 15. 6. 94	98,2			x
1634	RR	Prellenkirchen R (+3nE)	gesammelt: 16. 7. 94 präpariert: 20. 7. 94	72.2	x		x
1637	RR	Prellenkirchen R (+3nE)	gesammelt: 16. 7. 94 präpariert: 20. 7. 94	76.5	x		x
1638	RR	Prellenkirchen R (+3nE)	gesammelt: 16. 7. 94 präpariert: 20. 7. 94	73.5	x		x
1639	RR	Prellenkirchen R (+3nE)	gesammelt: 16. 7. 94 präpariert: 20. 7. 94	66,8			x
1643	RR	Prellenkirchen R (+3nE)	gesammelt: 4. 10. 94 präpariert: 12. 10. 94	74.9	x		
1531	LL	Fertöboz L+2nE nur weibl.	präpariert: 18. 5. 92	54			x
1532	LL	Fertöboz L+2nE nur weibl.	präpariert: 18. 5. 92	52,2			x
1541	LL	Marchfeld L+2nE	gesammelt: 22. 7. 92 präpariert: 28. 7. 92	55,5		x	x
1546	LL	Marchfeld L+2nE	gesammelt: 22. 7. 92 präpariert: 28. 7. 92	57,7		x	x
1547	LL	Marchfeld L+2nE	gesammelt: 23. 5. 92	49,4			x
1633	LL	Fertöboz L+2nE nur weibl.	gesammelt: 11. 6. 94 präpariert: 15. 6. 94	51,8			x
1653	LL	Fertöboz L+2nE nur weibl.	gesammelt: 4. 5. 95 präpariert: 7. 5. 95	40.6	x		x
1655	LL	Fertöboz L+2nE nur weibl.	gesammelt: 4. 5. 95 präpariert: 7. 5. 95	40.5	x		x
1656	LL	Fertöboz L+2nE nur weibl.	gesammelt: 4. 5. 95 präpariert: 7. 5. 95	37.5	x		x
1657	LL	Fertöboz L+2nE nur weibl.	gesammelt: 4. 5. 95 präpariert: 7. 5. 95	40.4	x		x
1059	LR	Sarrot	gesammelt: 18. 3. 90	69.2	x	x	x
1584	LR	Fertöboz L+2nE nur weibl.	gesammelt: 1993 präpariert: 1993	52		x	x

2.2 Herstellung der Hodenschnitte

Frisch entnommene Hoden wurden in folgender Weise zu Semidünnschnitten verarbeitet.

1. Fixierung: Für mindestens 24 Stunden in Bouin.

Fixiergemisch nach Bouin: 15 ml gesättigte Pikrinsäurelösung
(frisch ansetzen) 5 ml Formol (ca. 35%ig) zumischen
 1 ml Eisessig zusetzen

Nach dem Auswaschen (70% Ethylalkohol versetzt mit einigen Tropfen Ammoniak) in 70% Alkohol übertragen (Romeis, 1989 p97). Hoden die für zytologische Untersuchungen bereits im Alkohol-Eisessig Gemisch fixiert wurden wäscht man mehrmals mit deionisiertem Wasser und legt sie für mehrere Tage in Bouin. Das Färbeergebnis gleicht dem von frisch in Bouin fixiertem Gewebe.

2. Stückfärbung: Aus dem Hoden wurde eine zentrale Querschnittsscheibe von 1-2mm Dicke herausgeschnitten und mit saurem Hämalaun nach Mayer stückgefärbt. Diese "Vorfärbung" erhöht die Anfärbbarkeit der später hergestellten Schnitte, erleichtert die Handhabung während der Verarbeitung und ersetzt die für die Anfärbung von Semidünnschnitten oft nötige Nachfixierung mit hochgiftigem Osmiumtetroxid. Die lange haltbare Färbelösung wird wie folgend angesetzt:

1 g	Hämatoxylin in 1000 ml Aqua dest. lösen
200 mg	Natriumjodat (NaJO ₃) zugeben
50 g	Kalialaun begeben und unter Schütteln lösen
50 g	Chloralhydrat und
1 g	Zitronensäure zugeben und lösen

Das Gewebestück wurde 24 bis 48 Stunden gefärbt und dann ebensolange erst in Aqua dest. und danach in Leitungswasser gewaschen (nach Romeis, 1989 p218).

3. Entwässern: Durch aufsteigende Alkoholreihe (50-70-80-90-96-100% Ethylalkohol, 100% Polypropylenoxid) für jeweils zweimal 15 Minuten.

4. Einbetten in Kunstharz: Araldit wurde mit folgendem Mengenverhältnis der Komponenten frisch angesetzt.

Araldit (M)	11,6g
Härter 964B	9,8g
Beschleuniger 964C	0,46g
Dibuthylester	1,4g

In einer Mischung aus Polypropylenoxid und Einbettungsmittel zu gleichen Teilen wurde das Gewebe über Nacht infiltriert. Danach legt man das Gewebestück zweimal für mehrere Stunden in das reine Einbettungsmittel, überträgt es in eine entsprechende Einbettungsform und polymerisiert in einem Wärmeschrank bei 60°C über Nacht.

5. Vorbehandlung der Objektträger: Die unvermeidbare Neigung zur Faltenbildung bei großflächigen Semidünnschnitten während des Antrocknens am Objektträger kann durch die Herabsetzung der Oberflächenhaftung des Glases etwas gemildert werden. Dazu trägt man eine dünne Schicht Immersionsöl auf den Objektträger auf und wischt diese mit einem Leinentuch wieder ab bis keine Schlieren mehr auf der Glasoberfläche sichtbar sind.
6. Herstellung der Schnitte: Nach dem Trimmen des Harzblockes wurden mit einem Glasmesser 2.5 µm dicke Schnittserien angefertigt.
7. Aufziehen der Schnitte: Die Semidünnschnitte wurden auf Wassertropfen die auf vorbehandelten Objektträgern aufgebracht wurden übertragen, bei etwa 45°C gestreckt und angetrocknet und anschließend bei ca. 80-90°C etwa eine Stunde lang eingebrannt. Um dabei das Einbrennen von Staub zu vermindern wurde die Heizplatte mit einem Glassturz abgedeckt.
8. Färbung: Die durch Stückfärbung noch unzureichend kontrastierten Schnitte wurden mit Amidoschwarzlösung (eine Spatelspitze Amidoschwarz 10B in 20% Essigsäure) für 1-2 Tage nachgefärbt. Wurde nach mikroskopischer Kontrolle ein befriedigendes Färbeergebnis erreicht, wurden die Objektträger zweimal mit reiner ca. 20% Essigsäure) gespült. Danach wurde kurz zweimal mit deionisiertem Wasser gespült (bei längerem Einstellen in deionisiertes Wasser schwammen die Schnitte ab) und die Objektträger bei 40°C im Wärmeschrank getrocknet.
9. Einschließen der Schnitte: Die Schnitte dürfen nicht mit xylohlältigem Harz eingeschlossen werden da das Lösungsmittel Farbe auszieht. Stattdessen verwendet man Araldit oder Immersionsöl. Bei Verwendung des letzteren ist eine Umrandung des Deckglases mit Fixogum (Fa. Marabuwerke GmbH&Co, Deutschland) oder ähnlichem nötig um das langsame Ausfließen des Öles bei senkrechter Lagerung in der Präparateschachtel zu verhindern.

2.3 Zeichnen der Hodenquerschnitte, Bestimmung der Querschnittsfläche und der Tubulusanschnittsflächen

1. Zeichnen der Hodenquerschnitte: Mit der Zeicheneinrichtung eines Mikroskopes (Polyvar, Fa. Reichert) wurden Hodenumriß, Umriß der Tubulusanschnitte und die Anschnitte des Rete testes abgezeichnet. Weiters wurde eine 1mm lange Linie von einem Objektmikrometer maßstabsgerecht in die Zeichnung übertragen.
2. Bestimmung der Hodenquerschnittsfläche: Die angefertigte Zeichnung wurde mit einem Kopiergerät um 200% vergrößert (DIN A5 → DIN A3) um die weitere Bearbeitung zu erleichtern. Der ausgeschnittene Hodenquerschnitt wurde auf einer Laborwaage auf 10 mg genau abgewogen. Das Gewicht ist der Fläche direkt proportional unter der Annahme, daß das Papier in seiner Stärke über die gesamte Fläche in etwa konstant ist. Aus dem selben Papier wurde ein Rechteck mit der Kantenlänge der mitvergrößerten, übertragenen Referenzlänge geschnitten um das Papiergewicht zu ermitteln, das 1mm² Hodenquerschnittsfläche entspricht. Durch Division ergibt sich dann die tatsächliche Querschnittsfläche.
3. Bestimmung des relativen Flächenanteils der Tubulusanschnitte: Alle Tubulusanschnitte wurden aus der vergrößerten Zeichnung ausgeschnitten und einzeln auf einer Feinwaage (HL52, Fa. Mettler) auf 1µg genau abgewogen. Das addierte Gewicht aller Ausschnitte wurde als 100% angenommen und durch Division der relative Flächenanteil jedes einzelnen Tubulusanschnittes am Gesamtquerschnitt errechnet.

$$\text{relativer Anteil} = \frac{A_i \cdot g}{\left(\sum_{i=1}^n A_i\right) \cdot g} \cdot 100\%$$

A_i ... Fläche des i-ten Hodentubulus
 g ... Papiergewicht pro Flächeneinheit

4. Zeichnung des Hodenquerschnittes: Die vergrößerten Zeichnungen wurde mit einem Tuschestift auf Transparentpapier übertragen. Alle Tuschezeichnungen wurden danach mittels Kopiergerät wieder so verkleinert, daß sich ein einheitlicher Abbildungsmaßstab von 1:40 ergab.

2.4 Histologische Auswertungen

1. Dichte der Hodentubuli: Die Fläche des Hodenquerschnittes wurde wie oben beschrieben ermittelt. Dividiert man die Zahl der vorhandenen Tubuli durch diesen Flächenwert ergibt sich die Dichte der Hodentubuli pro Quadratmillimeter Hodenquerschnittsfläche.

2. Größe des Rete Testes: Um die Mächtigkeit des Hodennetzes abzuschätzen wurde gezählt wie oft Anschnitte dieser deutlich erkennbaren Gänge im ausgewerteten Hodenquerschnitt auftraten. Die Anzahl der Anschnitte wurde als Maß für die Ausbildung des Rete testes herangezogen.

3. Erfassung der Spermatogenesestadien: Das Auftreten folgender Spermatogenesestadien wurde für jeden einzelnen Tubulusanschnitt eines Hodenquerschnittes erhoben:

Spermatogonien I

Spermatogonien II

Spermatozyten I

Spermatozyten II

Spermatiden

Spermien (3 Klassen: keine, wenige, zahlreiche)

Die Anzahl der Hodentubuli wurde als 100% gesetzt und aus den erhobenen Werten die relative Häufigkeit des Auftretens der angeführten Spermatogenesestadien errechnet. Ein Wert von zB. 50% bedeutet, daß in der Hälfte aller Tubulusanschnitte das betreffende Stadium gefunden wurde.

2.5 Präparation und Vermessung der Spermien

1. Präparation: Mittels Rasierklinge wurden möglichst kleine Stücke vom fixierten Hodengewebe abgetrennt, mit einigen Tropfen Karminessigsäure versetzt auf einem Objektträger plziert und mit einem Deckglas eingeschlossen. Die Karminessigsäure wurde nach folgender Anleitung zubereitet (G. Linnert, 1977):

500 ccm Eisessig mit

500 ccm Aqua dest mischen

5 g Karmin beifügen

Diese Lösung für 2 Stunden mit Rückflußkühler kochen

(Siedesteinchen begeben!) und nach dem Abkühlen 2x filtrieren.

Nach dem Auftrocknen des überschüssigen Farbstoffes am Deckglasrand wurde das Präparat mit Fixogum (Fa. Marabuwerke GmbH&Co, Deutschland) umrandet und damit für einige Tage verwendbar gehalten. Die Spreitung des Zellmaterials wurde, falls nötig, durch vorsichtiges Klopfen mit der Bleistiftrückseite auf das Deckglas unterstützt.

2. Computerunterstützte Vermessung: Die nun deutlich rot angefärbten Spermienköpfe wurden mit folgender Gerätezusammenstellung vermessen:

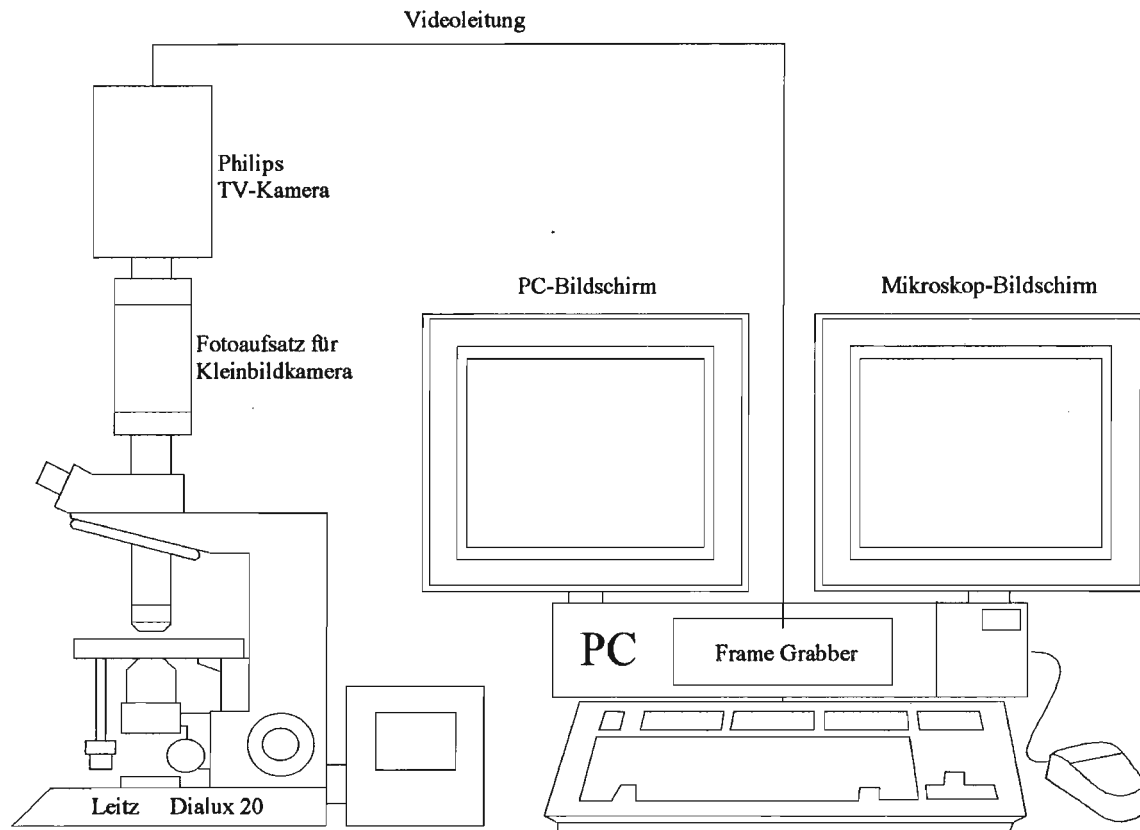


Abb. 8: Meßanordnung für die Vermessung von Spermien und Erythrozyten. Durch die Zwischenschaltung des Fotoaufsatzes konnte eine maximale Gesamtvergrößerung von 10.000x erreicht werden. Die Bilder wurden auf einem speziell dafür adaptierten Computer mit dem Programm ANALYSIS der Fa. Zeiss ausgewertet.

Die damit erreichbare Vergrößerung von etwa 10.000x (Größe am Bildschirm zu Originalgröße) erlaubt eine gute und relativ bequeme Vermessung von Spermienfläche, -länge und -durchmesser. Diese Auswertungen wurden mit dem Softwarepaket ANALYSIS der Firma Zeiss durchgeführt. Pro Tier wurden 30 Spermien gemessen. Um aus den Meßdaten das Spermiovolumen annähernd berechnen zu können wurden diese als Längszylinder mit beidseitig halbkugelförmigen Abschluß angenommen. Das Volumen ergibt sich danach durch Addition von Zylindervolumen plus Kugelvolumen. Durch Umformung erhält man folgende Formel:

$$\text{Spermiovolumen} = 1/12 \times \pi \times \varnothing^2 \times (3 \times L - \varnothing)$$

\varnothing ... Spermindurchmesser
 L ... Spermienlänge

2.6 Präparation und Vermessung der roten Blutkörperchen

Zur raschen und einfachen Beurteilung des Ploidiegrades der untersuchten Tiere eignet sich besonders die Größe der roten Blutkörperchen (Günther, 1977). In der Regel übersteigt bei diploiden Tieren, im Mittel, die Erythrozytengröße $320\text{ }\mu\text{m}^2$ nicht (Günther, 1990). Sind die Mittelwerte höher so liegen mit großer Sicherheit triploide Exemplare vor.

1. Präparation: Einige Tropfen der bei der Sektion der Tiere in die Leibeshöhle ausgetretenen Blutflüssigkeit wurden auf einem Objektträger ausgestrichen. Die getrockneten Präparate sind auch ohne weitere Fixierung lange haltbar, wenn sie trocken gelagert werden.

2. Flächenbestimmung: Die elliptisch geformten Erythrozyten wurde mit der oben beschriebenen Meßanordnung bei einer Gesamtvergrößerung von ca. 4.000x vermessen. Für jedes Tier wurde die Länge und Breite von 30 Zellen bestimmt und deren Fläche mittels folgender Formel ermittelt:

$$\text{Erythrozytenfläche} = \text{Länge} \times \text{Breite} \times \pi / 4$$

3. Ergebnisse

3.1 Größe der Erythrozyten

Die Daten zur Erythrozytengröße wurden von Elke Lebeth und Max Hable im Rahmen eines Wasserfroschpraktikums ermittelt.

Der Unterschied zwischen diploiden und triploiden Tieren in der Größe der roten Blutkörperchen fiel deutlich aus und gestattete die klare Zuordnung der entsprechenden Ploidiestufe. Das verwendete Mikroskop-Kamera-Computersystem erlaubte es mehr Zellen und diese auch gleichzeitig genauer zu messen als im selben Zeitraum mit einem Mikroskop alleine möglich gewesen wäre. Ein 'dünnerer' Blutausschlag in dem die Erythrozyten nur selten übereinander liegen wäre vorteilhaft. Die Erfassung der Fläche von vielen Zellen könnte dann zum Teil automatisiert werden.

Abb. 9: Tabelle der Erythrozytenmeßdaten. Die Fläche der ellipsenförmigen Zellen wurde aus Länge und Breite errechnet. Pro Tier wurden 30 Zellen vermessen. (Die Meßwerte wurden von Elke Lebeth und Max Hable im Rahmen eines Wasserfroschpraktikums ermittelt)

<i>Rana lessonae</i> diploid LL	Erythrozytenmeßdaten (Mittelwert, Standardabweichung)		
	Länge	Breite	Fläche
	[µm]	[µm]	[µm²]
1541	21.78	13.79	235.45
	2.07	0.69	22.76
1546	20.41	14.38	231.10
	1.40	1.01	28.36

<i>Rana ridibunda</i> diploid RR	Erythrozytenmeßdaten (Mittelwert, Standardabweichung)		
	Länge	Breite	Fläche
	[µm]	[µm]	[µm²]
1125	22.01	13.12	226.49
	1.52	0.62	17.08
1126	20.35	14.15	225.85
	1.55	0.72	17.90

<i>Rana kl. esculenta</i> diploid LR	Erythrozytenmeßdaten (Mittelwert, Standardabweichung)		
	Länge	Breite	Fläche
	[µm]	[µm]	[µm²]
1059	22.64	16.90	300.30
	1.42	0.91	23.55
1584	21.48	13.58	229.05
	1.35	0.96	21.02

<i>Rana kl. esculenta</i> triploid LLR	Erythrozytenmeßdaten (Mittelwert, Standardabweichung)		
	Länge	Breite	Fläche
	[μm]	[μm]	[μm^2]
107	27.27	16.24	347.54
	1.84	0.77	28.08
108	26.75	16.65	349.34
	1.92	1.17	31.36
1180	29.86	16.89	396.28
	1.93	0.93	38.25
1181	27.14	17.06	363.34
	1.93	1.13	33.10

<i>Rana lessonae</i> triploid LLL	Erythrozytenmeßdaten (Mittelwert, Standardabweichung)		
	Länge	Breite	Fläche
	[μm]	[μm]	[μm^2]
104	27.70	17.53	381.21
	1.41	0.79	28.32
105	25.92	16.52	336.55
	1.47	1.05	33.73
106	25.59	16.79	337.44
	1.63	0.72	29.78

Die Mittelwerte der Erythrozytenfläche von diploiden und triploiden Fröschen lagen klar auseinander. Lediglich einer der Hybriden (1059 LR) kam dem von Günther (1990) angegebenen oberen Grenzwert von $320 \mu\text{m}^2$ für diploide Tiere nahe.

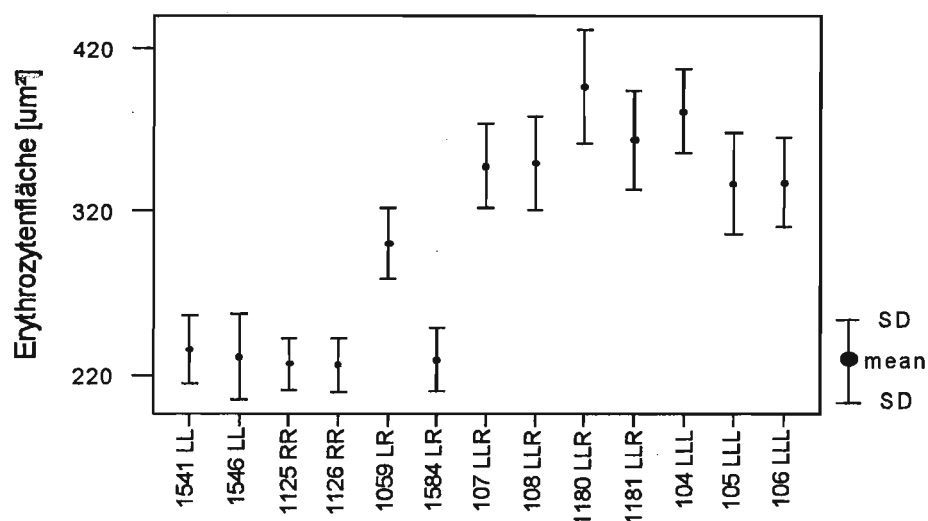


Abb. 10: Fläche der Erythrozyten. Je Tier wurden 30 Zellen vermessen. Die diploiden Tiere (gen. Typen LL, RR und LR) weisen im Mittel kleinere Flächen ihrer roten Blutkörperchen auf. Der obere Grenzwert für den Flächenmittelwert diploider Tiere von $320 \mu\text{m}^2$ (Günther, 1990) wurde nicht überschritten.

Die Größe der Erythrozyten lag bei jedem untersuchten Tier im Bereich einer Normalverteilung. Einen Vergleich der Taxa zeigen die folgenden Histogramme.

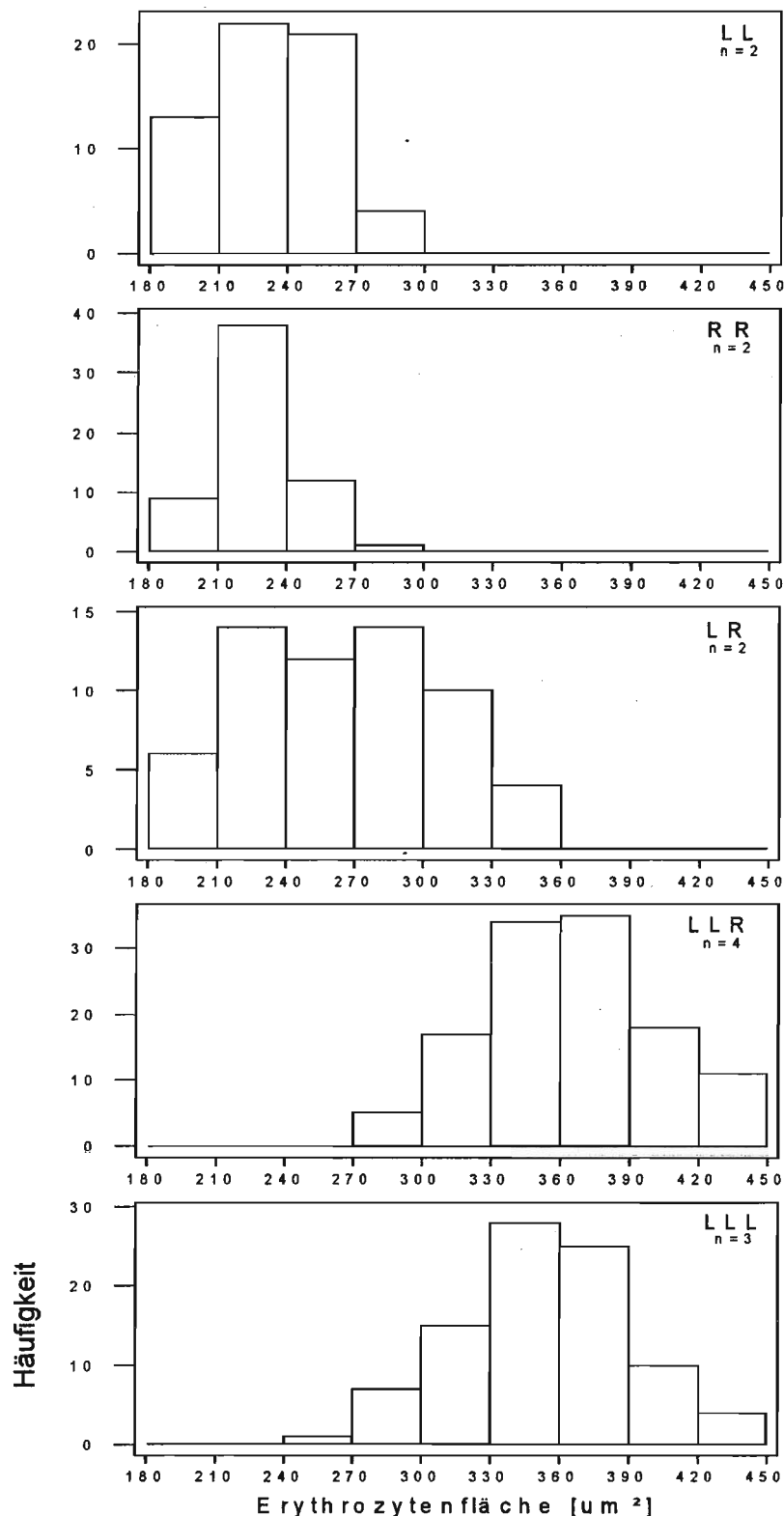


Abb. 11: Fläche der Erythrozyten. Je Tier wurden 30 Zellen vermessen. Ihre Größe war bei allen untersuchten Tieren normalverteilt. Diploide Taxa (gen. Typen LL, RR und LR) weisen signifikant kleinere Flächen ihrer roten Blutkörperchen auf als triploide. Die Mittelwerte der beiden untersuchten diploiden Hybriden *R.kl.esculenta* (LR) differierten stark wodurch sich hier eine schwach bimodale Verteilung für dieses Taxon ergab. Die triploiden Taxa (gen. Typen LLR und LLL) zeigen einen großen Streubereich der zur Überlappungen mit den diploiden Taxa führte.

Eine konzentriertere Darstellung der Meßwerte zeigt die abgewandelte Boxplotdarstellung (anstatt der bei Boxplots üblichen Darstellung der ersten und dritten Quartille wurde hier die Standardabweichung gewählt). Signifikante Unterschiede zwischen den diploiden Taxa wie hier ersichtlich, sind durch die geringe Anzahl der untersuchten Tiere aber nicht genügend abgesichert.

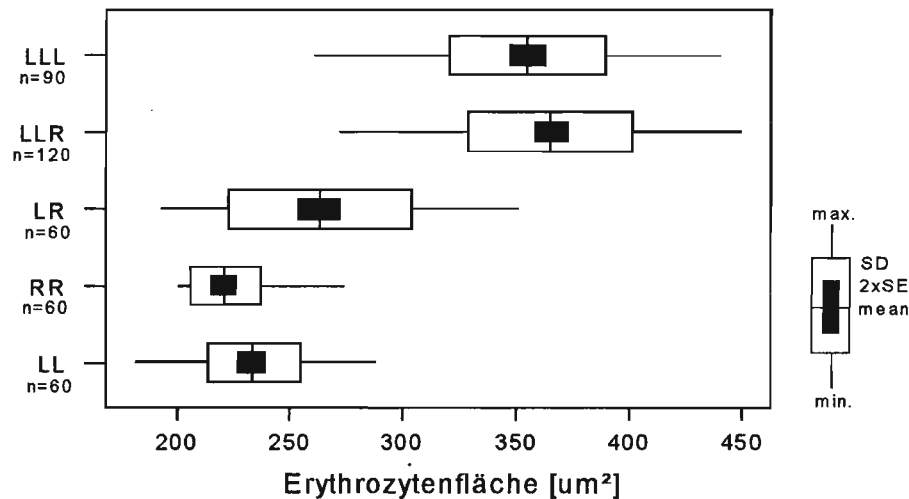
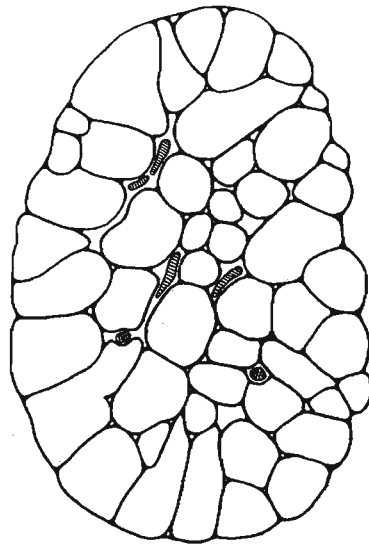


Abb. 12: Vergleich der Erythrozytenfläche. Die diploiden Tiere (gen. Typen LL, RR und LR) weisen im Mittel kleinere Flächen ihrer roten Blutkörperchen auf. Die triploiden Taxa (LLR und LLL) sowie der diploide Hybrid *R.kl.esculenta* (LR) zeigen einen großen Streubereich. Je Tier wurden 30 Zellen vermessen.

3.2 Hodenhistologie, Hodengröße

Die Herstellung der Schnitte in Semidünnschnittechnik ergab, in Verbindung mit der neu erarbeiteten Färbemethode, wesentlich bessere Bilder als die klassische Paraffinmethode mit der üblichen HE-Färbung. Neben der klaren Darstellung des Kernmaterials gelang es auch die Zell-, die Cysten- und die Tubuluswände deutlich anzufärben. Die Färbemethode funktionierte jedoch weit weniger gut bei Hoden die mit Alkohol-Eisessig fixiert wurden.



1mm

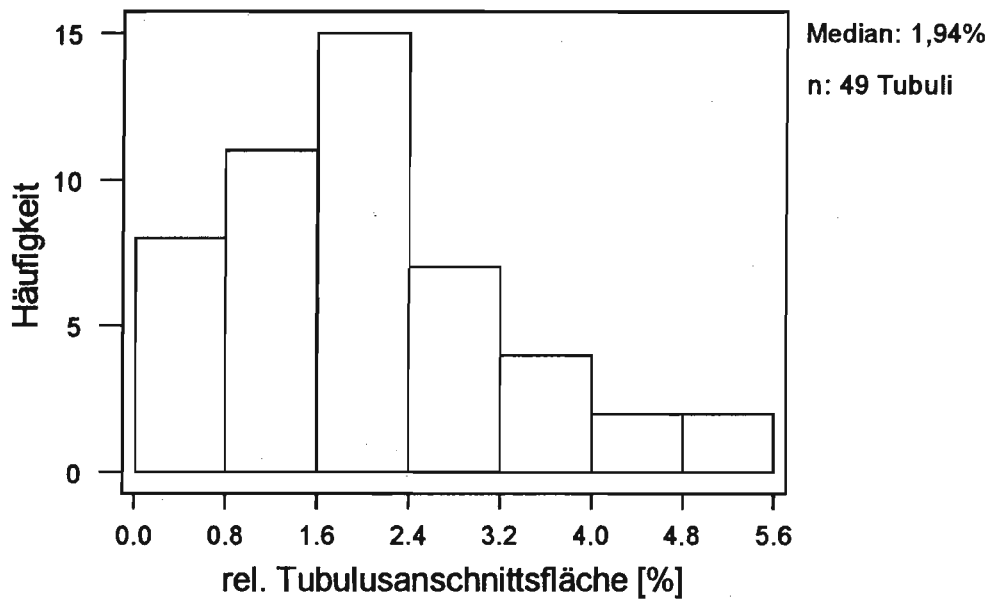
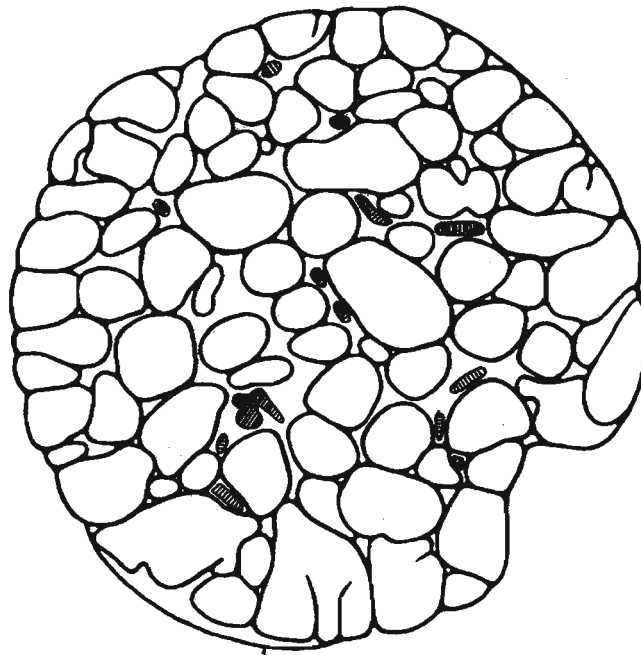
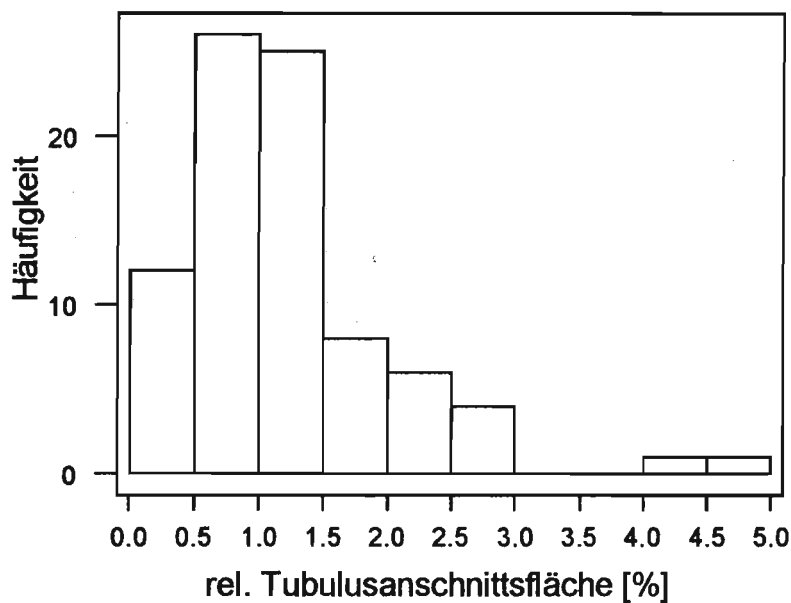


Abb. 13: Typischer Hodenquerschnitt von *R. lessonae* (gen. Typ: LL). Dargestellt wurde der Hodenumriß sowie die Anschnitte der Tubuli und des Rete testes (schraffiert). Das Histogramm zeigt die Größenverteilung der Tubulusanschnittsflächen wobei die einzelnen Anschnitte als Prozentanteil der Gesamtfläche ausgedrückt wurden.

Tier: 1655
Schnittnummer.: 1655-D3-11
Kopf-Rumpf Länge: 37,5 mm
Querschnittsfläche: 1,5 mm²



1mm

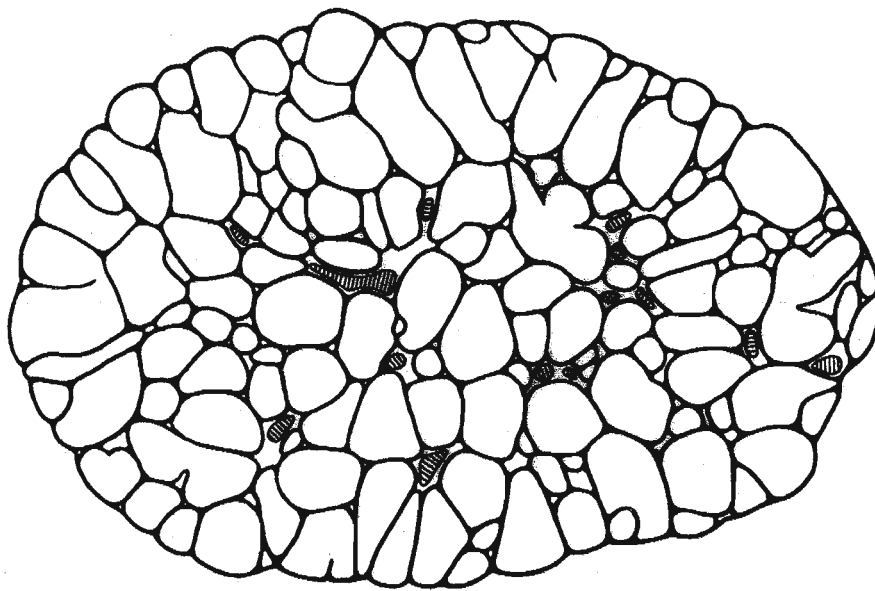


Median: 1,04%

n: 87 Tubuli

Abb. 14: Typischer Hodenquerschnitt von *R. kl. esculenta* (gen. Typ: LR). Dargestellt wurde der Hodenumriß sowie die Anschnitte der Tubuli und des Rete testes (schraffiert). Das Histogramm zeigt die Größenverteilung der Tubulusanschnittsflächen wobei die einzelnen Anschnitte als Prozentanteil der Gesamtfläche ausgedrückt wurden.

Tier: 1059
 Schnittnummer.: 1059-A10-3
 Kopf-Rumpf Länge: 69,2 mm
 Querschnittsfläche: 3,1 mm²



1mm

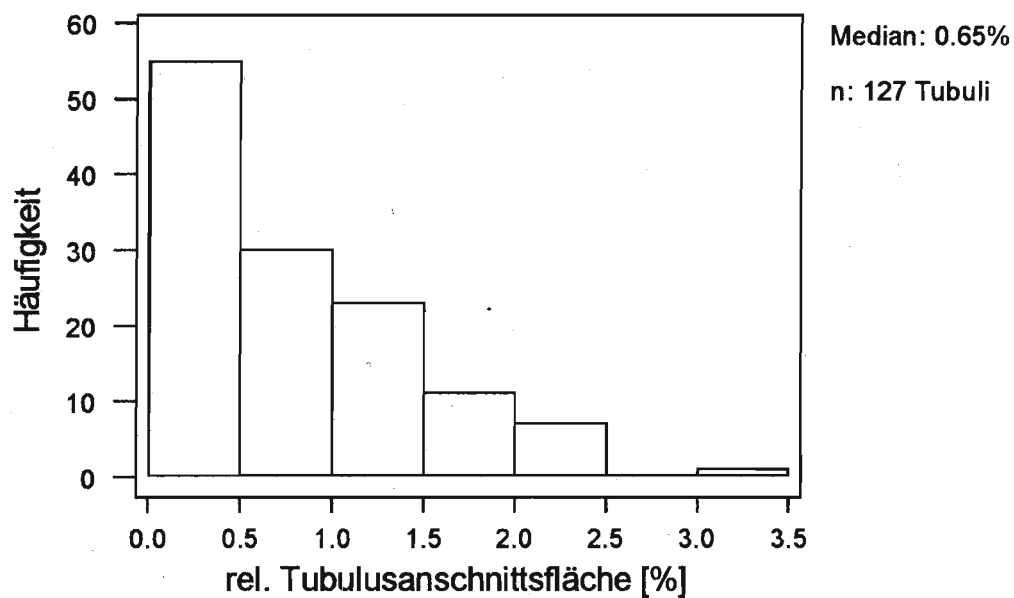
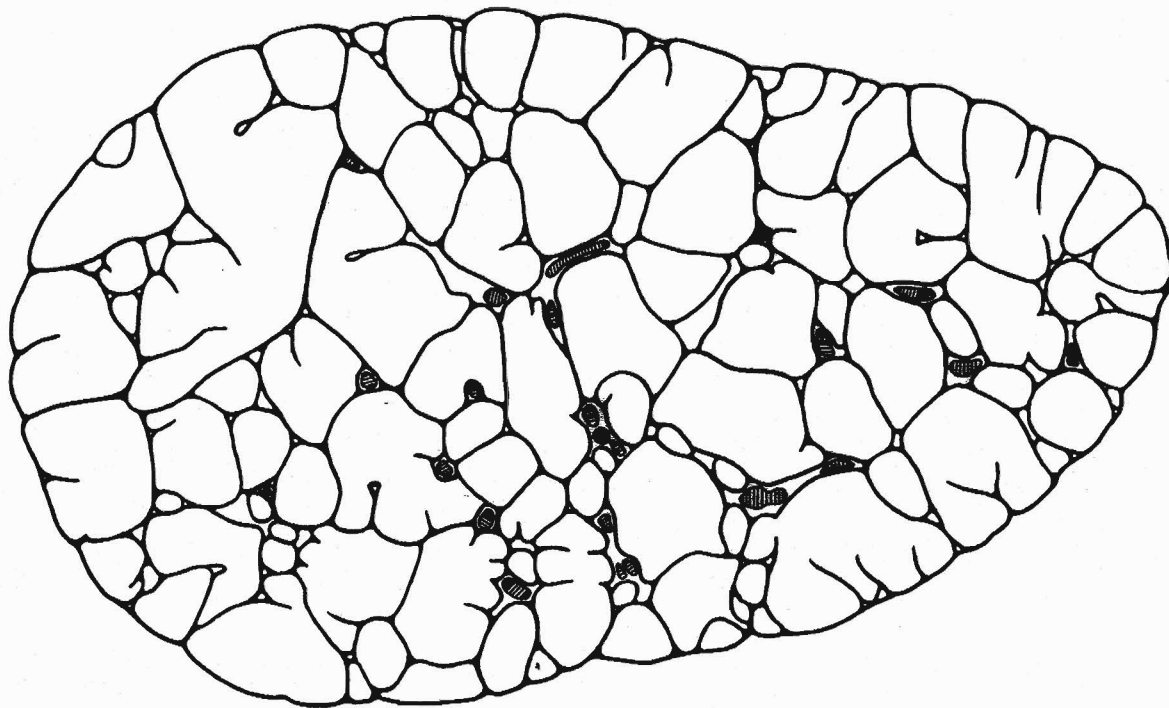


Abb. 15: Typischer Hodenquerschnitt eines triploiden *R. lessonae* (gen. Typ: LLL). Dargestellt wurde der Hodenumriß sowie die Anschnitte der Tubuli und des Rete testes (schraffiert). Das Histogramm zeigt die Größenverteilung der Tubulusanschnittsflächen wobei die einzelnen Anschnitte als Prozentanteil der Gesamtfläche ausgedrückt wurden.

Tier: 105
Schnittnummer.: 105-D1-4
Kopf-Rumpf Länge: 52 mm
Querschnittsfläche: 3,96 mm²



1mm

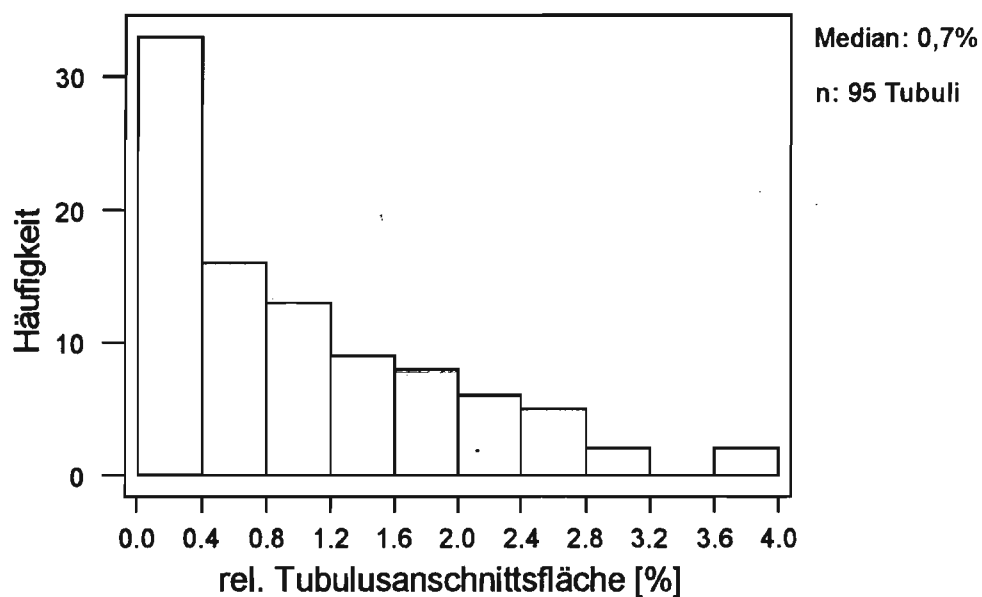
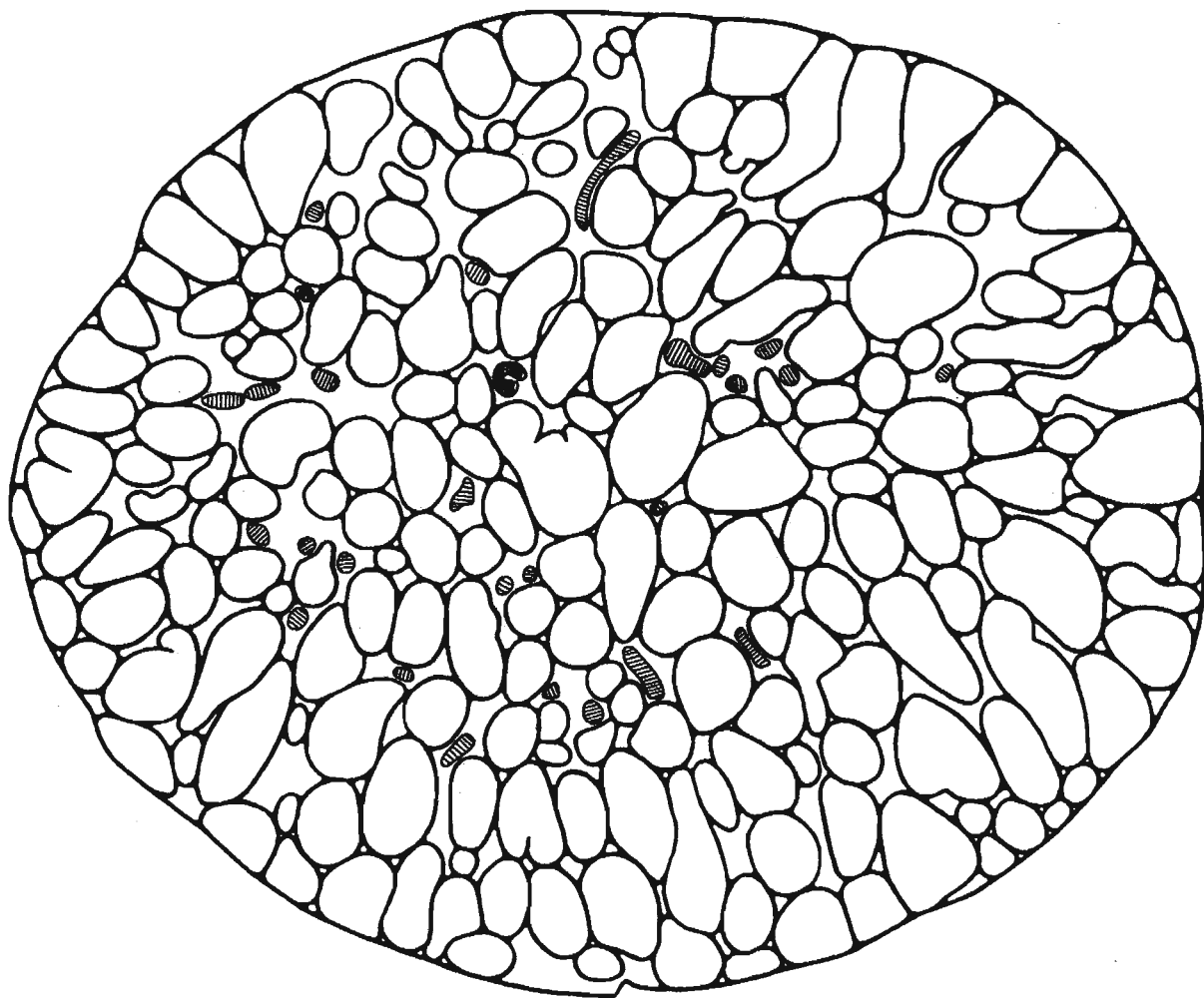


Abb. 16: Typischer Hodenquerschnitt eines triploiden *R.kl.esculenta* (gen. Typ: LLR). Dargestellt wurde der Hodenumriß sowie die Anschnitte der Tubuli und des Rete testes (schraffiert). Das Histogramm zeigt die Größenverteilung der Tubulusanschnittsflächen wobei die einzelnen Anschnitte als Prozentanteil der Gesamtfläche ausgedrückt wurden.

Tier: 107
Schnittnummer.: 107-C6-8
Kopf-Rumpf Länge: 59,3 mm
Querschnittsfläche: 6,8 mm²



1mm

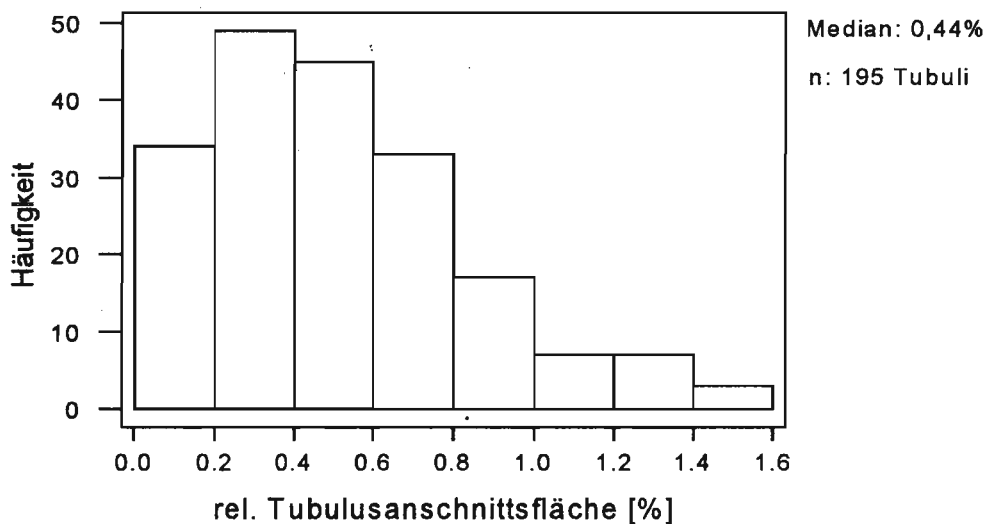


Abb. 17: Typischer Hodenquerschnitt von *R. ridibunda* (gen. Typ: RR). Dargestellt wurde der Hodenumriß sowie die Anschnitte der Tubuli und des Rete testes (schraffiert). Das Histogramm zeigt die Größenverteilung der Tubulusanschnittsflächen wobei die einzelnen Anschnitte als Prozentanteil der Gesamtfläche ausgedrückt wurden.

Tier: 1634
Schnittnummer.: 1634-A9-1
Kopf-Rumpf Länge: 72,2 mm
Querschnittsfläche: 9,6 mm²

Für den Vergleich der Hodenmorphologie wurden mehrere Parameter ausgewertet die, wie die weitere Untersuchung ergab, einen Zusammenhang zur Hodengröße bzw. zur Körperlänge der Tiere zeigten.

Abb. 18: Tabelle der Hodenquerschnittsdaten. Bei der absoluten und der relativen Tubulusanschnittsfläche wurde der Median angegeben da die Verteilung dieser Werte stark linksschief war. Die relative Tubulusanschnittsfläche bezieht die absolute Anschnittsfläche auf die Gesamtfläche. Pro Tier wurden drei Querschnitte ausgewertet. Die Schnittnummer setzt sich zusammen aus der fortlaufenden Sammlungsnummer des Tieres, aus der Schnittserie mit dem entsprechenden Objektträger und aus der Nummer des Schnittes auf diesem Objektträger.

<i>Rana lessonae</i>		Schnittauswertung					
diploid LL	Kopf-Rumpf Länge [mm]	Fläche des Hodenquerschnittes [mm ²]	Anschnitte Tubuli [Anzahl]	Anschnitte Rete testis [Anzahl]	Dichte der Hodentubuli [Tubulusanschnitte/mm ²]	absolute Tubulusanschnittsfläche Median [mm ²]	relative Tubulusanschnittfläche Median [%]
1653L-D1-3	40.6	2.27	65	7	28.69	0.032	1.42
1653L-E1-11	40.6	1.95	58	8	29.75	0.030	1.56
1653L-F2-6	40.6	1.74	55	10	31.52	0.030	1.75
1655L-D1-3	40.5	1.18	38	7	32.09	0.026	2.22
1655L-D3-11	40.5	1.51	49	6	32.55	0.029	1.94
1655L-E1-12	40.5	1.52	52	6	34.18	0.026	1.73
1656L-G1-1	37.5	1.42	43	8	30.35	0.028	1.94
1656L-G3-2	37.5	1.27	42	8	32.99	0.028	2.23
1656L-G4-14	37.5	1.22	42	12	34.39	0.021	1.71
1657L-E1-2	40.4	1.90	45	5	23.74	0.028	1.47
1657L-E3-1	40.4	1.52	47	5	30.55	0.022	1.42
1657L-E4-17	40.4	1.36	36	5	26.50	0.026	1.88
Mittelwert	39.75	1.57	47.63	7.25	30.61	0.027	1.77
Stabw	1.36	0.33	8.56	2.14	3.13	0.003	0.28

<i>Rana ridibunda</i>		Schnittauswertung					
diploid RR	Kopf-Rumpf Länge [mm]	Fläche des Hodenquerschnittes [mm ²]	Anschnitte Tubuli [Anzahl]	Anschnitte Rete testis [Anzahl]	Dichte der Hodentubuli [Tubulusanschnitte/mm ²]	absolute Tubulusanschnittsfläche Median [mm ²]	relative Tubulusanschnittfläche Median [%]
1610R-A1-2	69	7.30	224	37	30.68	0.031	0.42
1610R-A5-8	69	7.92	208	30	26.25	0.034	0.44
1610R-A10-7	69	7.23	205	29	28.34	0.032	0.44
1634R-A2-1	72.2	9.04	178	32	19.70	0.048	0.53
1634R-A9-1	72.2	9.56	195	28	20.40	0.042	0.44
1634R-B3-10	72.2	9.58	193	27	20.14	0.049	0.51
1637R-D1-2	76.5	7.10	210	25	29.56	0.033	0.46
1637R-D4-8	76.5	7.12	214	24	30.05	0.029	0.40
1637R-E3-10	76.5	7.05	196	23	27.79	0.040	0.56
1638R-B1-3	73.5	5.46	133	20	24.35	0.031	0.57
1638R-B4-3	73.5	5.55	138	18	24.87	0.037	0.66
1638R-B7-9	73.5	5.34	130	19	24.36	0.038	0.72
Mittelwert	72.80	7.35	185.33	26.00	25.54	0.037	0.51
Stabw	2.81	1.48	33.28	5.64	3.92	0.007	0.10

Rana kl.		Schnittauswertung					
esculenta	Kopf-Rumpf Länge [mm]	Fläche des Hodenquerschnittes [mm²]	Anschnitte Tubuli [Anzahl]	Anschnitte Rete testis [Anzahl]	Dichte der Hodentubuli [Tubulusanschnitte/mm²]	absolute Tubulusanschnittsfläche Median [mm²]	relative Tubulusanschnittfläche Median [%]
diploid LR							
Schnittnummer							
1059E-A5-3	69.2	3.11	96	15	30.83	0.029	0.93
1059E-A10-3	69.2	3.07	83	15	27.04	0.032	1.04
1059E-A15-4	69.2	2.98	93	16	31.19	0.030	0.99
Mittelwert	69.20	3.05	90.67	15.33	29.69	0.030	0.99
Stabw		0.07	6.81	0.58	2.30	0.001	0.05

Rana kl.		Schnittauswertung					
esculenta	Kopf-Rumpf Länge [mm]	Fläche des Hodenquerschnittes [mm²]	Anschnitte Tubuli [Anzahl]	Anschnitte Rete testis [Anzahl]	Dichte der Hodentubuli [Tubulusanschnitte/mm²]	absolute Tubulusanschnittsfläche Median [mm²]	relative Tubulusanschnittfläche Median [%]
triploid LLR							
Schnittnummer							
107LLR-C2-10	59.3	7.40	248	30	33.51	0.034	0.46
107LLR-C6-8	59.3	6.80	212	23	31.18	0.047	0.70
107LLR-C11-6	59.3	6.80	238	20	35.00	0.032	0.47
108LLR-B1-9	57.9	6.20	168	31	27.10	0.029	0.47
108LLR-B5-6	57.9	6.40	193	30	30.16	0.028	0.43
108LLR-B12-2	57.9	6.60	177	28	26.82	0.030	0.46
1180LLR-A1-2	66	4.40	178	19	40.45	0.020	0.46
1180LLR-A5-2	66	3.80	146	26	38.42	0.019	0.50
1180LLR-A10-9	66	3.70	150	25	40.54	0.020	0.53
1181LLR-A5-10	63.6	4.23	136	30	32.15	0.028	0.66
1181LLR-A10-9	63.6	4.10	135	26	32.93	0.022	0.54
1181LLR-A15-4	63.6	4.10	119	21	29.02	0.022	0.54
Mittelwert	61.70	5.38	175.00	25.75	33.11	0.028	0.52
Stabw	3.40	1.42	41.31	4.22	4.74	0.008	0.08

Rana		Schnittauswertung					
lessonae	Kopf-Rumpf Länge [mm]	Fläche des Hodenquerschnittes [mm²]	Anschnitte Tubuli [Anzahl]	Anschnitte Rete testis [Anzahl]	Dichte der Hodentubuli [Tubulusanschnitte/mm²]	absolute Tubulusanschnittsfläche Median [mm²]	relative Tubulusanschnittfläche Median [%]
triploid LLL							
Schnittnummer							
104LLL-J1-2	54.9	4.93	130	13	26.38	0.030	0.60
104LLL-J10-2	54.9	5.05	138	16	27.32	0.030	0.60
104LLL-J10-2	54.9	5.05	142	24	28.12	0.027	0.54
105LLL-D1-4	52	3.96	127	14	32.03	0.026	0.65
105LLL-D5-4	52	3.82	115	16	30.14	0.029	0.76
105LLL-D10-7	52	3.70	118	14	31.93	0.023	0.63
106LLL-B1-5	53	3.79	127	11	33.52	0.025	0.66
106LLL-B5-1	53	3.68	117	11	31.82	0.026	0.71
106LLL-B10-9	53	3.27	108	11	33.04	0.029	0.90
Mittelwert	53.30	4.14	124.67	14.44	30.48	0.027	0.67
Stabw	1.28	0.68	11.14	4.10	2.61	0.002	0.11

Übersicht		Schnittauswertung					
gen. Typ	Kopf-Rumpf Länge [mm]	Fläche des Hodenquerschnittes [mm²]	Anschnitte Tubuli [Anzahl]	Anschnitte Rete testis [Anzahl]	Dichte der Hodentubuli [Tubulusanschnitte/mm²]	absolute Tubulusanschnittsfläche [mm²]	relative Tubulusanschnittfläche [%]
LL	39.75	1.57	47.63	7.3	30.61	0.027	1.77
RR	72.8	7.35	185.33	26.0	25.54	0.037	0.51
LR	69.2	3.05	90.67	15.3	29.69	0.030	0.99
LLR	61.7	5.38	145.76	25.8	28.92	0.028	0.52
LLL	53.3	4.14	124.67	14.4	30.48	0.027	0.67

Die Hodenquerschnittsfläche stand im auffallend direkten und linearen Zusammenhang mit der Kopf-Rumpf Länge der Tiere, unabhängig vom Taxon. Die einzige Ausnahme bildete hier der diploide Hybrid *R.kl.esculenta* der im Vergleich zu seiner Körpergröße recht kleine Hoden besaß. Er liegt somit weit ab von der errechnete Regressionsgeraden wie die folgende Abbildung zeigt.

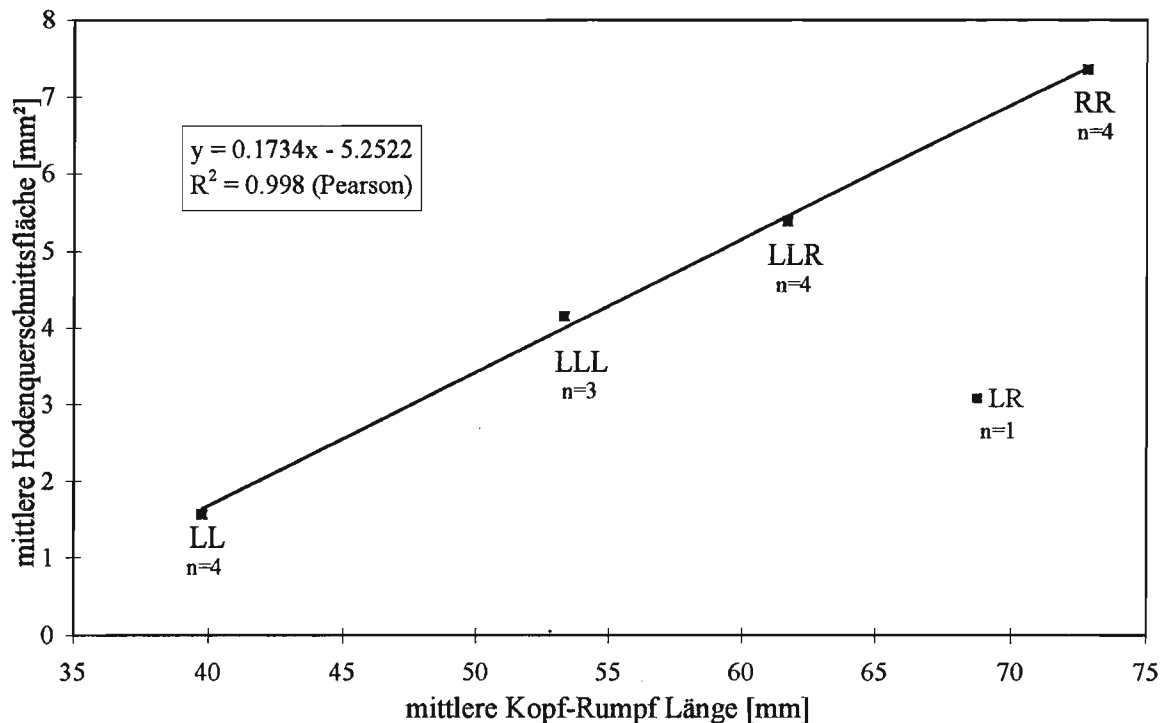


Abb. 19: Mittlere Hodenquerschnittsfläche bezogen auf die mittlere Kopf-Rumpf Länge. Schließt man den diploiden Hybriden *R.kl.esculenta* (LR) aus so ergibt sich für die übrigen Taxa ein stark linearer Zusammenhang zwischen Hodenquerschnittsfläche und Kopf-Rumpf Länge. *R.kl.esculenta* (LR) weist für seine Körpergröße relativ kleine Hoden auf.

Der Index aus dem Verhältnis von mittlerer Hodenquerschnittsfläche zu mittlerer Kopf-Rumpf Länge läßt sich zwar errechnen, würde aber die Taxa in zwei völlig andere Gruppen aufspalten. Die Ursache liegt hier in der Division eines Flächenwertes durch einen Längenwert (Bei gleichbleibenden Proportionen steigt mit der Länge eines Tieres die Querschnittsfläche mit der zweiten Potenz). Als Ausweg bietet sich an aus der Hodenquerschnittsfläche einen äquivalenten Hodenradius zu errechnen.

$$\text{äquivalenter Hodenradius } r_e = \sqrt{\frac{\text{Hodenquerschnittsfläche}}{\pi}}$$

Für das Verhältnis der Mittelwerte von äquivalentem Hodenradius r_e zur Kopf-Rumpf Länge ergibt sich danach folgendes Bild:

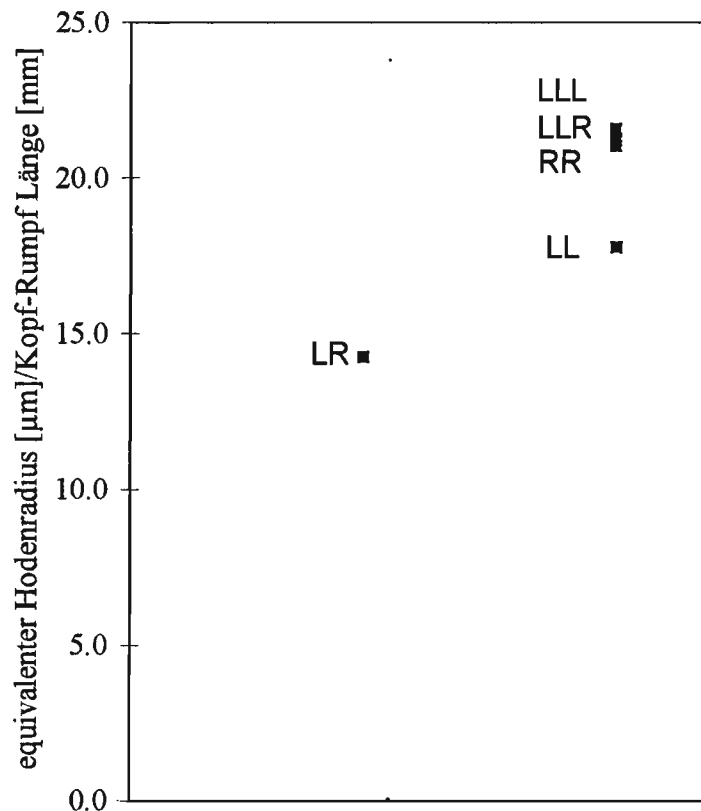


Abb. 20: Das Verhältnis von mittlerem äquivalentem Hodenradius r_e zur mittleren Kopf-Rumpf Länge. Hohe Werte erreichen *R.ridibunda* (RR) und die beiden triploiden Taxa (LLL und LLR). Einen relativ kleinen Index besitzt der diploide Hybrid *R.kl.esculenta* (LR). *R.lessonae* (LL) liegt etwa intermediär.

Wie einleitend erwähnt stehen einige der erhobenen histologischen Daten der Hodenmorphologie in Relation zur Hodenquerschnittsfläche. Die Anzahl der Rete testes- und der Tubulusanschnitte steigt mit zunehmender Querschnittsfläche. Ebenso steigt die Körperlänge an, mit Ausnahme des diploiden Hybriden *R.kl.esculenta* der für seine Hodengröße eine überproportionale Kopf-Rumpf Länge aufweist.

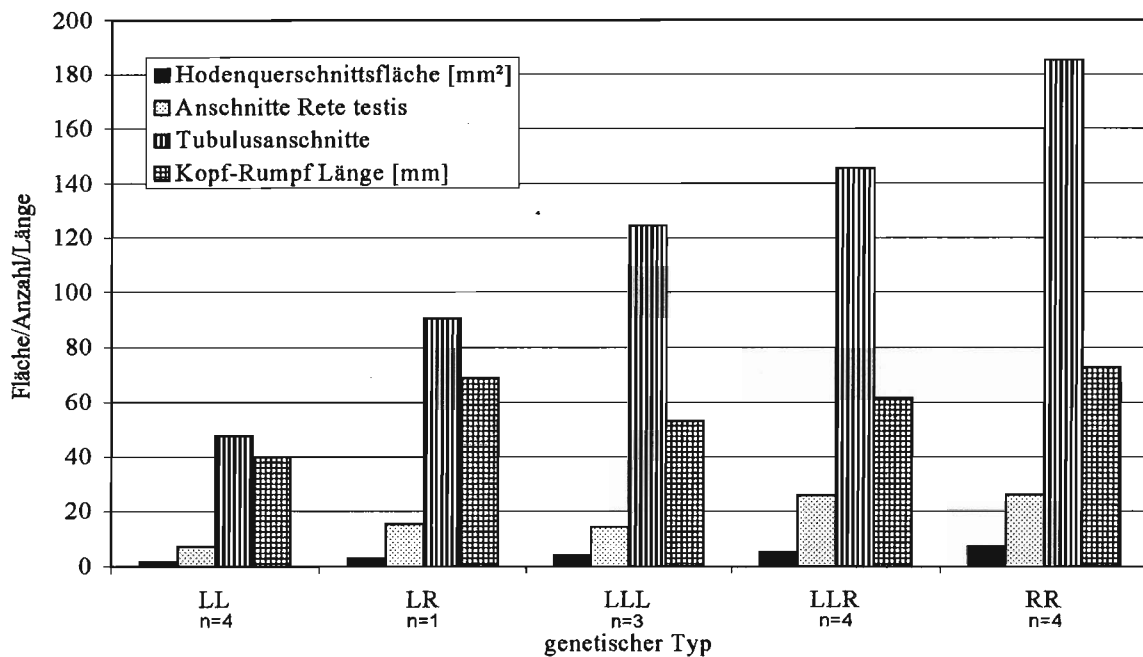


Abb. 21: Ausgewählte Hodenquerschnittsdaten und Kopf-Rumpf Länge. Die Taxa sind hier nach der Größe der mittleren Hodenquerschnittsfläche geordnet. Die Anzahl der Rete testis- und Tubulusanschnitte steigt mit zunehmender Querschnittsfläche. Die Kopf-Rumpf Länge steigt ebenfalls gleichmäßig, bei *R.kl.esculenta* (LR) aber überproportional an.

Eine genauere Darstellung zeigt, daß die Anzahl der Rete testis-Anschnitte bei weitem nicht so stark mit steigender Hodenquerschnittsfläche zunimmt wie die Anzahl der Tubulusanschnitte. Ein Vergleich der Steigungen der errechneten Regressionsgeraden gibt ein Verhältnis von etwa 1:7 in der Zunahme der Anschnitte an.

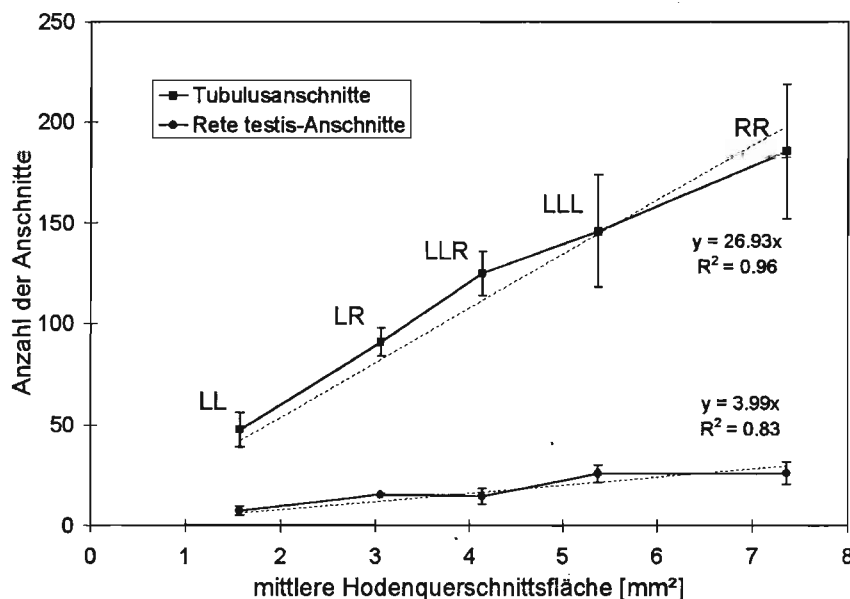


Abb. 22: Anzahl der Rete testis-Anschnitte (●) und der Tubulusanschnitte (■) bezogen auf die mittlere Hodenquerschnittsfläche. Zu jeder Datenreihe wurde auch eine Regressionsgerade (punktiert) eingezeichnet die den Nullpunkt schneidet. Die Anzahl der Anschnitte steigt mit zunehmender Querschnittsfläche an, jedoch nehmen die Rete testes-Anschnitte viel langsamer zu.

Im Gegensatz zur Zunahme der Tubulusanschnitte mit steigender Hodenquerschnittsfläche bleibt die mittlere, absolute Tubulusanschnittsfläche relativ konstant. Bezieht man diesen absoluten Flächenwert auf die Summe aller Tubulusanschnittsflächen so ergibt sich der Graph der relativen Anschnittsflächen. *R. lessonae* besitzt demnach die größten und *R. ridibunda* die kleinsten Tubulusanschnittsflächen bezogen auf die Hodenquerschnittsfläche.

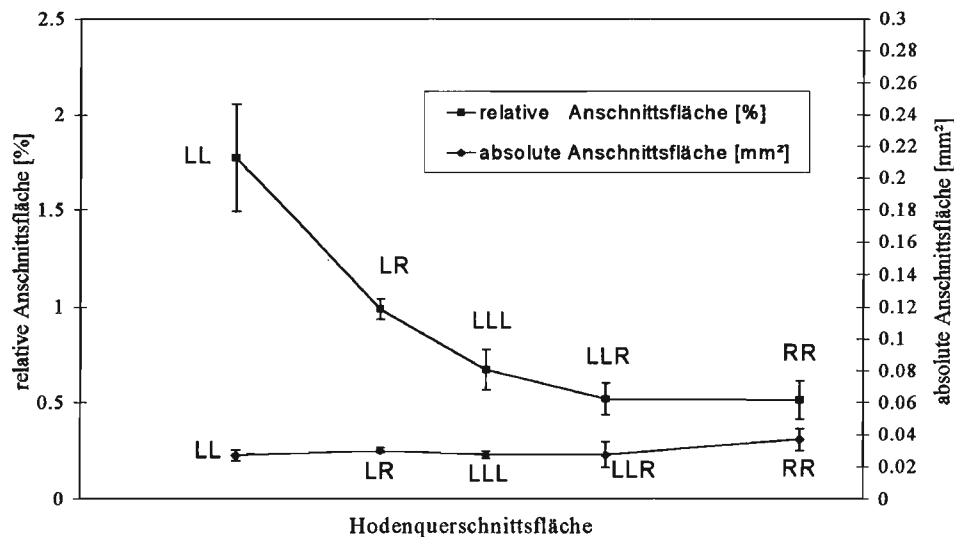


Abb. 23: Absolute (●) und relative (■) Anschnittsfläche der Hodentubuli. Die Taxa sind nach der Größe des Hodenquerschnittes geordnet. Die absolute Tubulusanschnittsfläche nimmt nur sehr gering mit steigender Hodenquerschnittsgröße zu. Die relative Anschnittsfläche stellt diesen Wert als Prozentanteil der Summe aller Tubulusanschnittsflächen dar. Der Hybrid *R.kl.esculenta* (LR) liegt auch hier zwischen seinen beiden Ausgangsarten *R.ridibunda* (RR) und *R. lessonae* (LL).

Die Dichte der Hodentubuli gibt die Anzahl der Tubulusanschnitte pro mm² Hodenquerschnittsfläche an. Dieser Parameter zeigte keinen ersichtlichen Zusammenhang mit der Kopf-Rumpf Länge oder mit der Hodenquerschnittsfläche. Die geringste Dichte weist hier *R. ridibunda*. Der diploide Hybrid *R.kl.esculenta* hat eine Tubulusdichte die zwischen seinen beiden Ausgangsarten liegt.

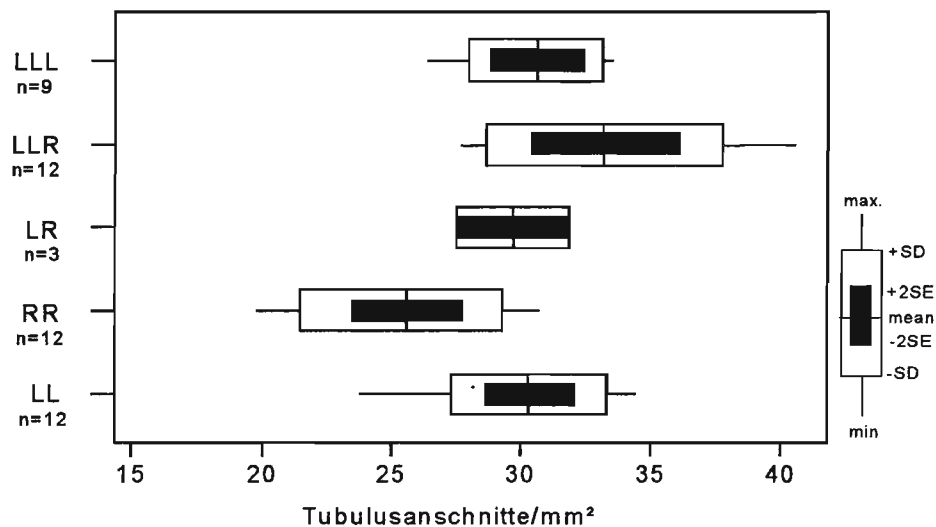


Abb. 24: Dichte der Tubuli im Hodenquerschnitt. *R.ridibunda* (RR) weist die geringste Dichte auf. Der Hybrid *R.kl.esculenta* (LR) liegt bei diesem Wert hier zwischen seinen beiden Ausgangsarten *R.ridibunda* und *R.lessonae* (LL).

3.3 Häufigkeit der Spermatogenesestadien

Die bei der Paraffinschnitttechnik regelmäßig auftretende 'Verschleppung' oder 'Verschmierung' von Spermien des Tubuluslumens über den Hodenquerschnitt fiel bei der Einbettung in Kunstharz weg. Die erarbeitete Färbemethode stellte das Chromatin sehr deutlich dar und erlaubte eine recht sichere Zuordnung der Zellen zum jeweiligen Stadium der Spermatogenese.

Etwas problematischer war es bei Querschnitten die von Hoden stammten die mit Alkohol-Eisessig Gemischen fixiert wurden. Bei diesen ergaben sich weniger klare Bilder. Nach längerem Einarbeiten konnte man aber meist auch in diesen Fällen die Stadien unterscheiden.

Abb. 25: Häufigkeitstabelle der Spermatogenesestadien im Hodenquerschnitt. Der Wert gibt an wieviele Prozent der Tubulusanschnitte das entsprechende Stadium aufwiesen. Die Schnittnummer setzt sich zusammen aus der fortlaufenden Sammlungsnummer des Tieres, aus der Schnittserie mit dem entsprechenden Objektträger und aus der Nummer des Schnittes auf diesem Objektträger.

SPG I	primäre Spermatogonien	SPT	Spermatiden
SPG II	sekundäre Spermatogonien	k SP	keine Spermien
SPC I	primäre Spermatozyten	w SP	wenige Spermien
SPC II	sekundäre Spermatozyten	v SP	viele Spermien

<i>Rana lessonae</i> diploid LL Schnittnummer	Tubulusanschnitte mit									
	SPG I [%]	SPG II [%]	SPC I [%]	SPC II [%]	SPT [%]	k SP [%]	w SP [%]	v SP [%]	Spermien [%]	ohne Spermien [%]
1653L-D1-3	67.7	90.8	72.3	1.5	10.8	40.0	60.0	0.0	60.0	40.0
1653L-E1-11	74.1	93.1	81.0	10.3	19.0	43.1	56.9	0.0	56.9	43.1
1653L-F2-6	72.7	83.6	78.2	7.3	7.3	34.5	63.6	1.8	65.5	34.5
1655L-D1-3	73.7	100.0	73.7	2.6	57.9	31.6	50.0	18.4	68.4	31.6
1655L-D3-11	87.8	98.0	65.3	20.4	59.2	22.4	46.9	30.6	77.6	22.4
1655L-E1-12	82.7	96.2	61.5	5.8	53.8	32.7	36.5	30.8	67.3	32.7
1656L-G1-1	74.4	100.0	37.2	9.3	48.8	46.5	48.8	4.7	53.5	46.5
1656L-G3-2	73.8	100.0	33.3	7.1	35.7	50.0	42.9	7.1	50.0	50.0
1656L-G4-14	73.8	100.0	40.5	2.4	21.4	69.0	28.6	2.4	31.0	69.0
1657L-E1-2	83.3	93.3	40.0	6.7	43.3	33.3	56.7	10.0	66.7	33.3
1657L-E3-1	51.6	90.3	54.8	0.0	38.7	38.7	51.6	9.7	61.3	38.7
1657L-E4-17	75.0	91.7	58.3	0.0	29.2	33.3	50.0	16.7	66.7	33.3
Mittelwert	74.2	94.7	58.0	6.1	35.4	39.6	49.4	11.0	60.4	39.6
Stabw	9.0	5.2	16.9	5.7	18.0	11.9	9.9	11.0	11.9	11.9

<i>Rana ridibunda</i> diploid RR Schnittnummer	Tubulusanschnitte mit									
	SPG I [%]	SPG II [%]	SPC I [%]	SPC II [%]	SPT [%]	k SP [%]	w SP [%]	v SP [%]	Spermien [%]	ohne Spermien [%]
1610R-A1-2	32.3	97.8	82.8	41.9	26.9	21.5	44.1	34.4	78.5	21.5
1610R-A5-8	30.8	98.1	75.7	41.1	26.2	20.6	37.4	42.1	79.4	20.6
1610R-A10-7	30.3	100.0	85.9	40.4	20.2	15.2	51.5	33.3	84.8	15.2
1634R-A2-1	35.8	92.6	93.7	55.8	30.5	34.7	55.8	9.5	65.3	34.7
1634R-A9-1	34.9	99.1	92.5	36.8	38.7	26.4	64.2	9.4	73.6	26.4
1634R-B3-10	31.8	96.3	81.3	36.4	32.7	31.8	57.0	11.2	68.2	31.8
1637R-D1-2	33.3	100.0	81.9	48.6	41.0	23.8	43.8	32.4	76.2	23.8
1637R-D4-8	48.2	99.1	84.5	37.3	32.7	26.4	47.3	26.4	73.6	26.4
1637R-E3-10	54.1	96.9	85.7	51.0	28.6	17.3	53.1	29.6	82.7	17.3
1638R-B1-3	51.6	98.7	94.1	47.1	34.0	39.2	41.8	19.0	60.8	39.2
1638R-B4-3	57.7	98.6	95.8	46.5	31.0	28.2	35.2	36.6	71.8	28.2
1638R-B7-9	52.2	100.0	97.1	43.5	39.1	18.8	53.6	27.5	81.2	18.8
Mittelwert	41.1	98.1	87.6	43.9	31.8	25.3	48.7	25.9	74.7	25.3
Stabw	10.6	2.1	6.8	6.1	6.0	7.3	8.6	11.1	7.3	7.3

<i>Rana kl. esculenta</i> diploid LR Schnittnummer	Tubulusanschnitte mit									
	SPG I [%]	SPG II [%]	SPC I [%]	SPC II [%]	SPT [%]	k SP [%]	w SP [%]	v SP [%]	Spermien [%]	ohne Spermien [%]
1059E-A5-3	44.4	88.9	64.4	37.8	28.9	22.2	48.9	28.9	77.8	22.2
1059E-A10-3	57.1	92.9	59.5	40.5	42.9	19.0	31.0	50.0	81.0	19.0
1059E-A15-4	37.2	88.4	62.8	46.5	23.3	14.0	32.6	53.5	86.0	14.0
Mittelwert	46.3	90.0	62.3	41.6	31.7	18.4	37.5	44.1	81.6	18.4
Stabw	10.1	2.5	2.5	4.5	10.1	4.2	9.9	13.3	4.2	4.2

<i>Rana kl. esculenta</i> triploid LLR Schnittnummer	Tubulusanschnitte mit									
	SPG I [%]	SPG II [%]	SPC I [%]	SPC II [%]	SPT [%]	k SP [%]	w SP [%]	v SP [%]	Spermien [%]	ohne Spermien [%]
107LLR-C2-10	33.3	77.8	75.0	39.8	18.5	27.8	42.6	29.6	72.2	27.8
107LLR-C6-8	32.0	80.4	69.1	44.3	17.5	14.4	50.5	35.1	85.6	14.4
107LLR-C11-6	33.6	72.9	72.9	43.0	14.0	27.1	42.1	30.8	72.9	27.1
108LLR-B1-9	20.3	57.4	59.5	26.4	15.5	19.6	50.0	30.4	80.4	19.6
108LLR-B5-6	28.8	60.1	63.2	25.2	16.0	22.7	41.7	35.6	77.3	22.7
108LLR-B12-2	34.1	68.1	63.0	24.6	16.7	25.4	41.3	33.3	74.6	25.4
1180LLR-A1-2	20.4	57.8	59.9	13.3	8.6	22.9	50.3	26.7	77.1	22.9
1180LLR-A5-2	21.3	58.4	56.2	23.6	18.0	18.0	60.7	21.3	82.0	18.0
1180LLR-A10-9	21.1	54.7	51.6	31.6	10.5	24.2	60.0	15.8	75.8	24.2
1181LLR-A5-10	17.4	70.9	52.3	12.8	7.0	29.1	52.3	18.6	70.9	29.1
1181LLR-A10-9	21.5	63.3	58.2	25.3	13.9	24.1	69.6	6.3	75.9	24.1
1181LLR-A15-4	22.9	67.5	59.0	36.1	10.8	20.5	67.5	12.0	79.5	20.5
Mittelwert	25.6	65.8	61.7	28.8	13.9	23.0	52.4	24.6	77.0	23.0
Stabw	6.3	8.5	7.4	10.4	3.8	4.3	10.0	9.6	4.3	4.3

<i>Rana lessonae</i> triploid LLL Schnittnummer	Tubulusanschnitte mit									
	SPG I [%]	SPG II [%]	SPC I [%]	SPC II [%]	SPT [%]	k SP [%]	w SP [%]	v SP [%]	Spermien [%]	ohne Spermien [%]
104LLL-J1-2	58.6	85.7	65.7	11.4	18.6	28.6	67.1	4.3	71.4	28.6
104LLL-J10-2	51.4	90.0	72.9	18.6	18.6	35.7	61.4	2.9	64.3	35.7
104LLL-J10-2	34.5	87.9	65.5	29.3	22.4	29.3	55.2	15.5	70.7	29.3
105LLL-D1-4	44.4	88.9	51.9	14.8	11.1	27.8	72.2	0.0	72.2	27.8
105LLL-D5-4	50.0	90.0	60.0	13.3	13.3	35.0	60.0	5.0	65.0	35.0
105LLL-D10-7	39.3	82.0	62.3	14.8	8.2	42.6	54.1	3.3	57.4	42.6
106LLL-B1-5	42.9	73.0	60.3	15.9	6.3	20.6	79.4	0.0	79.4	20.6
106LLL-B5-1	51.6	84.4	65.6	9.4	9.4	26.6	71.9	1.6	73.4	26.6
106LLL-B10-9	55.6	90.7	57.4	18.5	13.0	29.6	70.4	0.0	70.4	29.6
Mittelwert	47.6	85.8	62.4	16.2	13.4	30.6	65.7	3.6	69.4	30.6
Stabw	7.8	5.6	6.0	5.8	5.4	6.3	8.6	4.8	6.3	6.3

Überblick gen. Typ	Tubulusanschnitte mit									
	SPG I [%]	SPG II [%]	SPC I [%]	SPC II [%]	SPT [%]	k SP [%]	w SP [%]	v SP [%]	Spermien [%]	ohne Spermien [%]
LL	74.2	94.7	58.0	6.1	35.4	39.6	49.4	11.0	60.4	39.6
RR	41.1	98.1	87.6	43.9	31.8	25.3	48.7	25.9	74.7	25.3
LR	46.3	90.0	62.3	41.6	31.7	18.4	37.5	44.1	81.6	18.4
LLR	25.6	65.8	61.7	28.8	13.9	23.0	52.4	24.6	77.0	23.0
LLL	47.6	85.8	62.4	16.2	13.4	30.6	65.7	3.6	69.4	30.6

Bei der Auswertung der Spermatogenesestadien im Hodenquerschnitt ergab sich eine große Ähnlichkeit der Häufigkeitsprofile und eine auffallend hohe Häufigkeit von sekundären Spermatogonien und primären Spermatozyten. Die triploiden Taxa (LLR, LLL) und der diploide Hybrid *R.kl.esculenta* (LR) zeigten dieses Maxima weniger stark ausgeprägt. Spermien kamen zwar in allen Querschnitten vor, jedoch wies auch ein beachtlicher Teil der Tubulusanschnitte, nämlich 18% - 39% keine Spermien auf. Die grundsätzliche Ähnlichkeit des Spermatogeneseverlaufes zeigt die folgende Abbildung.

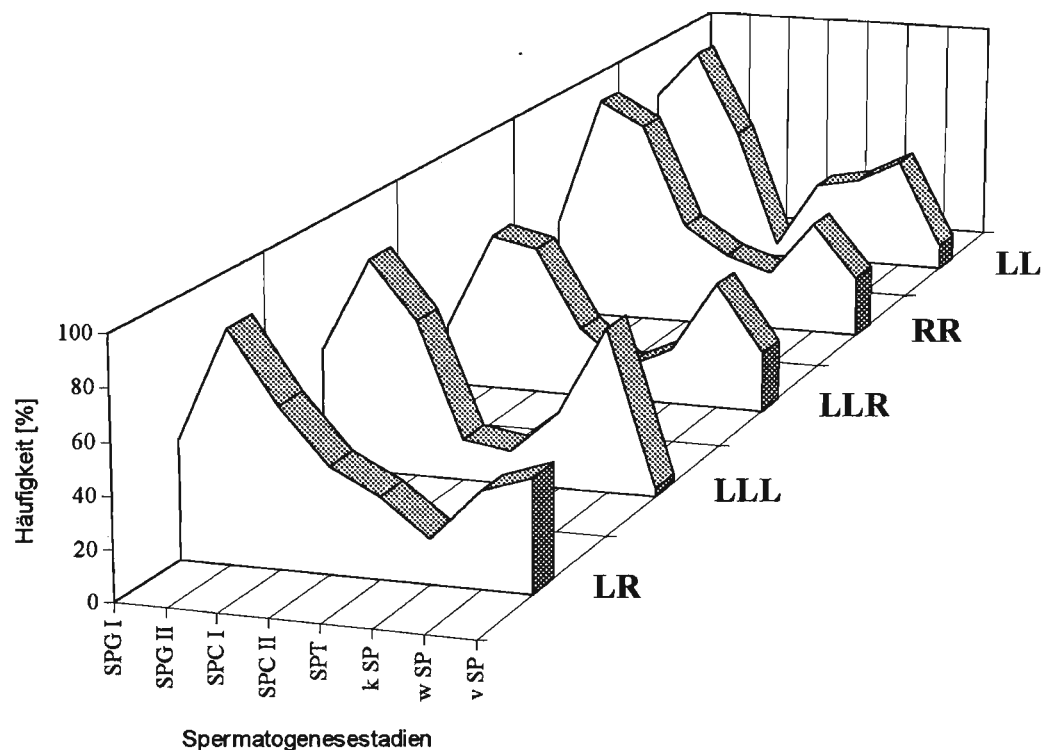


Abb. 26: Häufigkeit von Spermatogenesestadien im Hodenquerschnitt. Die Höhe des Profils gibt an wieviele Prozent der Tubulusanschnitte das entsprechende Stadium aufwiesen. Die Profilverläufe gleichen sich weitgehend und zeigen einen hohen Anteil von sekundären Spermatogonien und primären Spermatozyten.

SPG I	primäre Spermatogonien	SPT	Spermatiden
SPG II	sekundäre Spermatogonien	k SP	keine Spermien
SPC I	primäre Spermatozyten	w SP	wenige Spermien
SPC II	sekundäre Spermatozyten	v SP	viele Spermien

3.4 Größe der Spermien

Bei der Vermessung der Spermien traten im wesentlichen drei Größenklassen hervor die sich in ihrer Länge, im Durchmesser und daraus resultierend in ihrem Volumen sehr deutlich unterschieden. *R. lessonae* produzierte fast ausschließlich Spermien der kleinen Größenklasse. *R. ridibunda* und diploide *R. kl. esculenta* hatten daneben regelmäßig etwa doppelt so große Spermien die wiederum für triploide *R. kl. esculenta* ganz typisch waren. Bei triploiden *R. lessonae* traten Spermien aller drei Größenklassen auf.

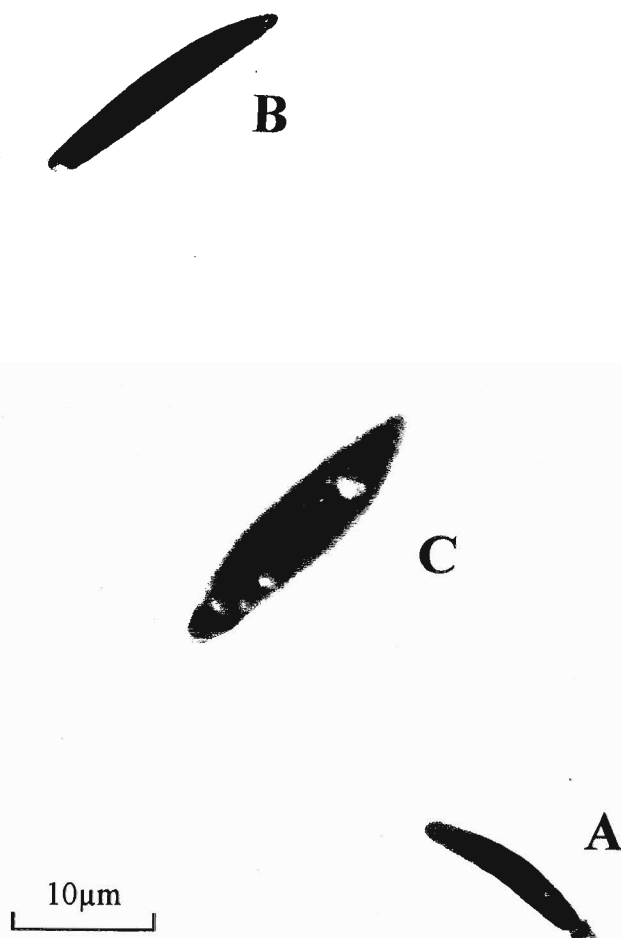


Abb. 27: Die drei Spermigrößenklassen bei Wasserfröschen. *R. lessonae* produzierte fast ausschließlich Spermien der Größe A. Bei *R. ridibunda* und bei diploiden *R. kl. esculenta* traten daneben regelmäßig etwa doppelt so große Spermien (B) auf. Die Spermien triploider *R. kl. esculenta* waren überwiegend von der Größe B. Triploide *R. lessonae* wiesen außer Spermien dieser beiden Größenklassen noch besonders große Spermien auf (C).

Da die Angabe eines Gesamtmittelwertes beim Auftreten mehrerer Größenklassen statistisch nicht korrekt ist wurden die nur in geringem Umfang vorgefunden größeren Spermien der diploiden Taxa in der folgenden Meßwertetabelle nicht berücksichtigt. Nur bei triploiden *R. lessonae* traten die drei Größenklassen im gleichen Ausmaß auf. Hier wurde zu Vergleichszwecken doch ein Gesamtmittelwert berechnet.

Abb. 28: Tabelle der Spermienmeßdaten. Pro Tier wurden 30 Spermien ausgewertet. Die angegebene Fläche entspricht der auf den Bildschirm des Meßsystems projizierten Grundrißfläche. Das Volumen wurde aus Länge und Durchmesser (\emptyset) errechnet. Die sehr geringe Anzahl von abnormal großen Spermien wurden bei der Berechnung der Mittelwerte der diploiden Taxa (LL, RR und LR) nicht berücksichtigt. Die Angabe eines Gesamtmittelwertes für triploide *R. lessonae* ist wegen der trimodalen Spermiengrößenverteilung nicht korrekt, wurde aber aus Vergleichsgründen angeführt. (Die Daten der Tiere 1126 und 1180 wurden von Elke Lebeth und Max Hable im Rahmen eines Wasserfroschpraktikums ermittelt)

<i>Rana</i> <i>ridibunda</i>	Spermienmeßdaten (Mittelwert, Standardabw.)			
	Fläche [μm^2]	Länge [μm]	\emptyset [μm]	Volumen [μm^3]
1126	25.76	12.80	2.30	49.93
	2.01	1.14	0.19	6.94
1610	25.31	13.03	2.21	46.87
	2.16	1.33	0.19	6.55
1619	27.33	13.14	2.30	51.44
	1.52	1.08	0.15	5.59
1631	24.13	12.26	2.16	42.34
	1.42	0.99	0.13	4.14
1634	23.81	13.33	2.00	39.26
	2.31	1.78	0.22	5.95
1637	25.38	14.16	2.04	44.04
	2.41	1.40	0.18	7.60
1638	26.77	13.29	2.22	48.47
	2.06	1.21	0.17	6.00
1639	27.47	14.78	2.06	46.24
	2.74	2.04	0.27	7.82
Mittelwert	25.74	13.35	2.16	46.07
Stabw	1.37	0.79	0.12	4.04

<i>Rana lessonae</i>	Spermienmeßdaten (Mittelwert, Standardabw.)			
	Fläche [µm²]	Länge [µm]	Ø [µm]	Volumen [µm³]
1531	25.37	13.20	2.13	44.22
	1.45	1.06	0.10	3.39
1532	23.76	11.69	2.28	44.55
	1.36	0.87	0.12	4.13
1541	26.80	12.30	2.42	51.90
	2.16	1.71	0.22	5.10
1546	25.27	11.25	2.50	50.27
	2.73	1.78	0.27	6.45
1547	27.47	12.92	2.32	51.34
	2.27	1.32	0.18	6.55
1633	25.38	12.35	2.30	48.17
	1.35	1.05	0.13	5.04
1653	21.35	11.81	2.03	36.10
	1.63	1.09	0.17	5.09
1655	20.59	11.58	1.99	34.02
	1.79	0.94	0.19	6.09
1656	24.65	12.96	2.16	44.70
	1.24	1.01	0.18	5.16
1657	23.17	12.08	2.13	40.27
	1.42	1.28	0.16	3.28
Mittelwert	24.38	12.21	2.23	44.55
Stabw	2.20	0.65	0.17	6.21

<i>Rana kl. esculenta</i>	Spermienmeßdaten (Mittelwert, Standardabw.)			
	Fläche [µm²]	Länge [µm]	Ø [µm]	Volumen [µm³]
1059	25.43	13.48	2.09	43.89
	1.29	1.09	0.16	4.91
1584	26.09	12.89	2.24	47.62
	1.60	0.97	0.17	5.95
Mittelwert	25.76	13.19	2.17	45.75
Stabw	0.47	0.42	0.10	2.64

<i>Rana kl. esculenta</i> triploid (LLR)	Spermienmeßdaten (Mittelwert, Standardabw.)			
	Fläche [µm²]	Länge [µm]	Ø [µm]	Volumen [µm³]
107	39.55	15.24	2.94	94.33
	3.22	2.38	0.34	9.48
108	43.01	16.75	2.93	104.76
	3.99	2.02	0.33	13.88
1180	41.94	16.20	2.95	102.88
	4.21	2.05	0.30	16.16
1181	43.81	16.76	3.03	109.43
	4.99	3.21	0.48	15.51
Mittelwert	42.08	16.24	2.96	102.85
Stabw	1.85	0.71	0.05	6.31

<i>Rana lessonae</i> triploid (LLL)	Spermienmeßdaten (Mittelwert, Standardabw.)			
	Fläche [µm²]	Länge [µm]	Ø [µm]	Volumen [µm³]
104	46.50	17.28	3.03	120.76
	11.09	3.11	0.44	40.18
105	38.38	15.85	2.72	88.78
	9.16	2.75	0.59	37.78
106	49.64	17.66	3.34	142.92
	9.38	3.63	0.66	39.55
Mittelwert	44.84	16.93	3.03	117.49
Stabw	5.81	0.95	0.31	27.22

<i>Übersicht</i> gen. Typ	Spermienmeßdaten (Mittelwert, Standardabw.)			
	Fläche [µm²]	Länge [µm]	Ø [µm]	Volumen [µm³]
LL	24.38	12.21	2.23	44.55
RR	25.74	13.35	2.16	46.07
LR	25.76	13.19	2.17	45.75
LLR	42.08	16.24	2.96	102.85
LLL	44.84	16.93	3.03	117.49

Die Größe der Spermien war bei der überwiegenden Anzahl der *R. lessonae* Individuen einheitlich. Alle anderen Tiere produzierten regelmäßig Spermien die man zwei bis drei Größenklassen zuordnen konnte. Einen Vergleich der Spermienvolumenverteilung zeigen die folgenden Histogramme.

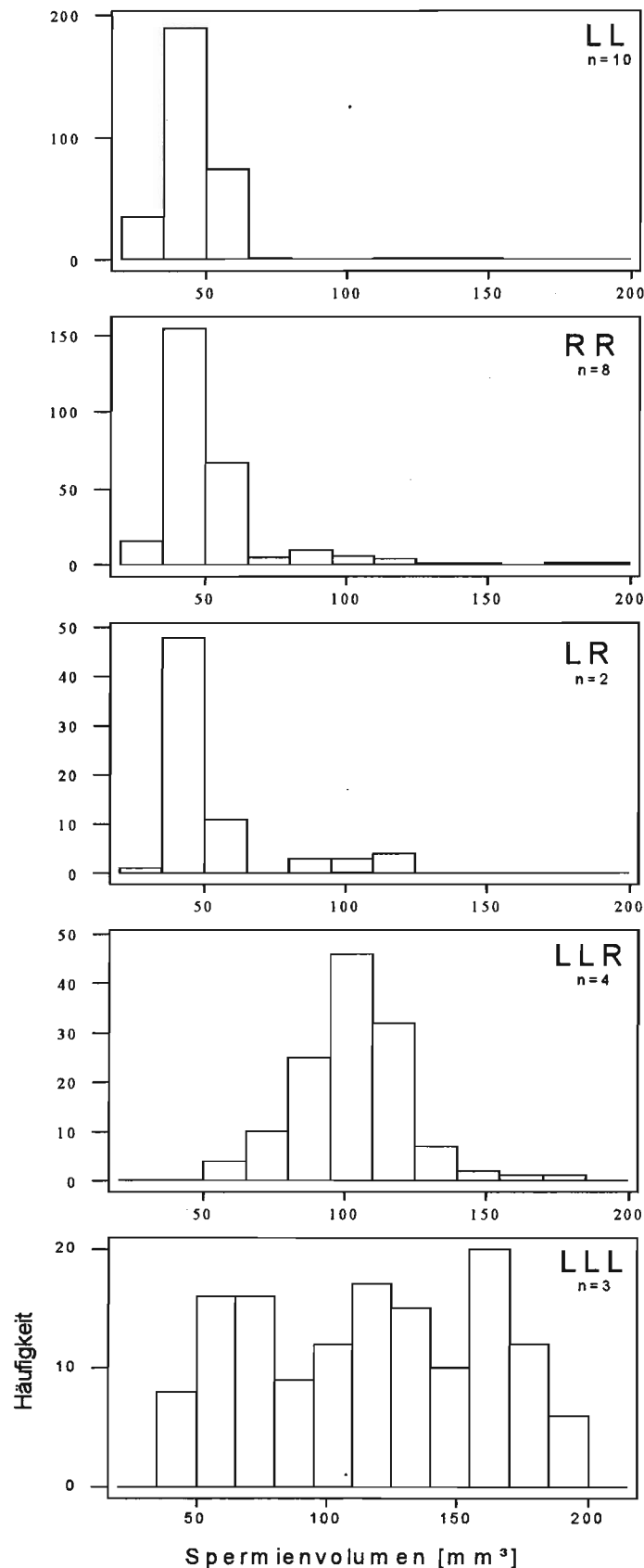


Abb. 29: Verteilung des errechneten Spermienvolumens. Alle diploiden Taxa produzieren weitgehend gleich große Spermien. Nur in sehr geringen Umfang finden sich darunter größere Spermien. Bei triploiden Hybriden (LLR) finden sich hauptsächlich etwa doppelt so große Spermien. Das Histogramm der triploiden *R. lessonae* (LLL) weist mit drei deutlichen Maxima auf die Produktion von Spermien dreier Größenklassen hin.

Die beiden Ausgangsarten *R.ridibunda* und *R.lessonae* unterschieden sich signifikant ($p=0,05$) in der Länge der Spermien, nicht aber in Durchmesser und Volumen.

Die nur in sehr geringem Ausmaß vorgefundenen, übernormal großen Spermien der diploiden Taxa wurden bei den folgenden Abbildungen nicht berücksichtigt um den Mittelwert der am häufigsten auftretenden Spermengrößenklasse nicht zu verfälschen.

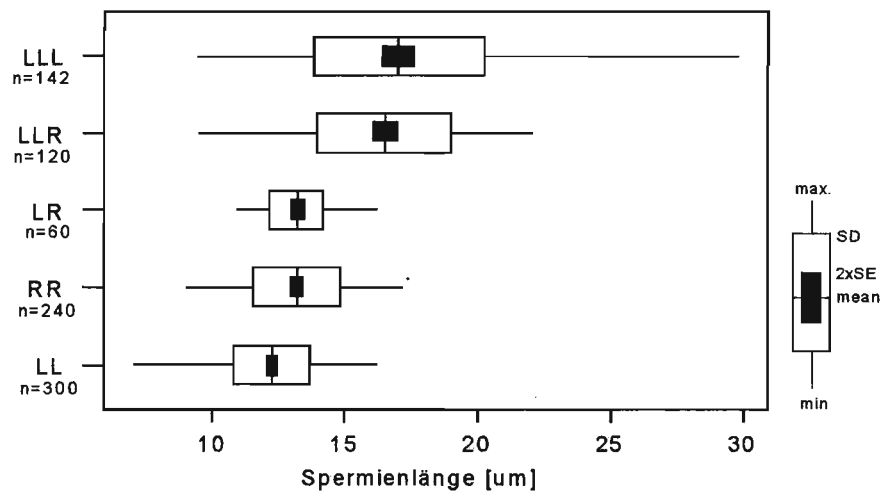


Abb. 30: Länge der Spermien. Die Ausgangsarten *R.ridibunda*, *R.lessonae* und deren Hybrid *R.kl.esculenta* (gen. Typen RR, LL, LR) produzieren Spermien von vergleichbarer Länge (die sehr geringe Anzahl von größeren Spermien wurde hier nicht berücksichtigt). Zwischen *R.ridibunda* und *R.lessonae* liegt ein signifikanter Unterschied ($p=0,05$) vor. Die Spermien der triploiden Taxa (LLR und LLL) sind im Mittel um ca. 1/3 länger.

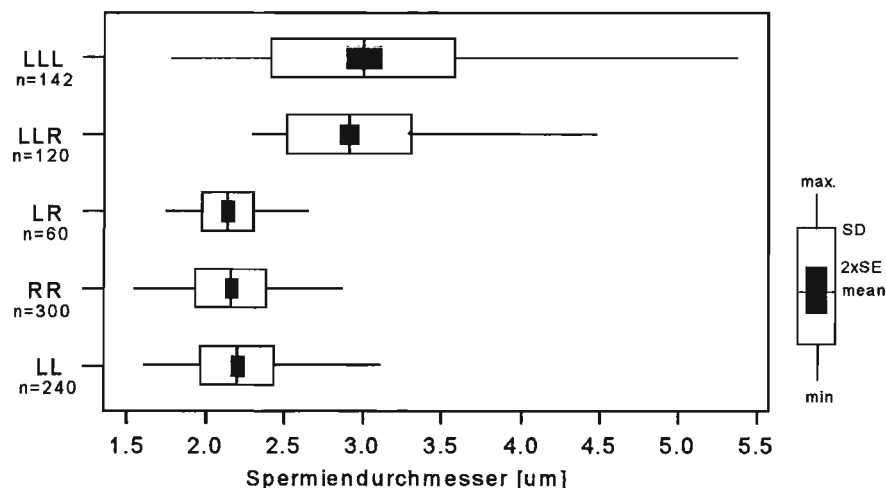


Abb. 31: Durchmesser der Spermien. Die Ausgangsarten *R.ridibunda*, *R.lessonae* und deren Hybrid *R.kl.esculenta* (gen. Typen RR, LL, LR) produzieren Spermien mit sehr ähnlichem Durchmesser ohne signifikanten Unterschied (die sehr geringe Anzahl von größeren Spermien wurde hier nicht berücksichtigt). Die Spermien der triploiden Taxa (LLR und LLL) sind im Mittel um ca. 1/3 dicker.

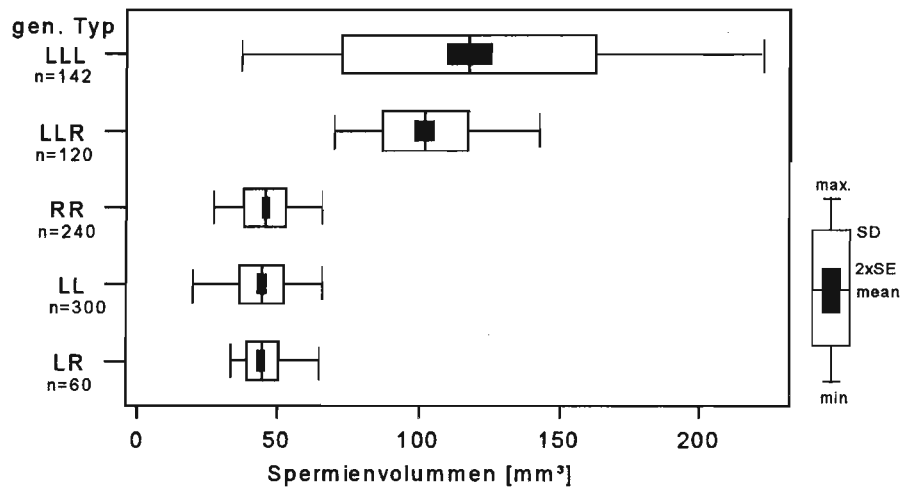


Abb. 32: Verteilung des Spermienvolumens Die Ausgangsarten *R. ridibunda*, *R. lessonae* und deren Hybrid *R. kl. esculenta* (gen. Typen RR, LL, LR) produzieren Spermien von sehr ähnlicher Größe die sich jedoch nicht signifikant unterscheiden (die sehr geringe Anzahl von größeren Spermien wurde hier nicht berücksichtigt). Etwa doppelt so groß ist das Spermienvolumen triploider Hybriden (LLR). Bei den triploiden *R. lessonae* (LLL) fanden sich Spermien recht unterschiedlicher Größe. Dies bedingte den großen Streubereich.

4. Diskussion

4.1 Die Größe der Erythrozyten

Günther (1990) gab als Grenzwert $320\mu\text{m}^2$ mittlere Erythrozytenfläche für die Unterscheidung von diploiden und triploiden adulten Tieren an. Letztere liegen deutlich über diesem Wert. Wie aus Abb. 10 ersichtlich ordnen sich die hier untersuchten Tiere klar unterhalb bzw. oberhalb dieser Trennlinie an. Eine eindeutige Zuordnung zur jeweiligen Ploidiestufe war damit gut möglich. Innerhalb der diploiden Taxa fand Günther (1973) geringe, aber signifikante Unterschiede in der Größe der Erythrozyten. Die roten Blutkörperchen von *R. ridibunda* haben demnach kleinere Flächen als die von *R. lessonae* und diploiden *R. kl. esculenta*. Die in Abb. 12 sichtbaren Unterschiede zwischen den untersuchten diploiden Taxa entsprechen den Ergebnis von Günther.

Die gefundenen Werte für Länge und Fläche der Zellen liegen im Schnitt etwas unter den Angaben von Polls Pelaz & Graf (1988) aus einer Untersuchung diploider und triploider Wasserfrösche einer französischen Population. Die Werte decken sich aber gut mit den Angaben von Plötner & Klinkhardt (1992) aus einer Studie einer norddeutschen Wasserfroschpopulation. Die beiden Autoren weisen auch darauf hin, daß generelle Unterschiede in den Mittelwerten der Erythrozytengröße vermutlich auf unterschiedliche Präparationsweisen zurückzuführen sind. Der signifikante Unterschied zwischen diploiden und triploiden Tieren bleibt innerhalb der untersuchten Gruppe aber in jedem Fall erhalten.

Für triploide *R. lessonae* liegen hier erstmals Angaben über deren Erythrozytengröße vor. Die Flächenmittelwerte sind denen triploider *R. kl. esculenta* ähnlich. Sie unterscheiden sich nicht signifikant von diesen wie in Abb. 10 und Abb. 12 zu sehen ist. Die beiden genetischen Konstitutionen I.I.I. und LLR scheinen einen ähnlichen Gen-Dosis Effekt auf die Größe dieser Blutzellen auszuüben. Für triploide *R. ridibunda* findet sich kein Wert in der Wasserfroschliteratur.

Berger & Ogielska (1994) beschrieben zwei außergewöhnliche Nachkommen einer Kreuzung eines *R. kl. esculenta*-Weibchen mit einem *R. lessonae*-Männchen. Eine Körperseite entsprach morphologisch dem *esculenta*-Phänotyp, während die andere den *lessonae*-Phänotyp zeigte. Die Erythrozyten zerfielen in zwei Größenklassen, wobei die kleinen Zellen haploiden und die großen triploiden Chromosomensatz besaßen. Tunner (1980) fand unter Kreuzungsnachkommen, bei morphologischen und elektrophoretischen Untersuchungen, einen Hybriden, der auch im somatischen Gewebe, neben Bereichen mit diploidem Chromosomensatz, solche mit triploidem besaß.

Bei allen hier untersuchten Einzeltieren lag nun die Erythrozytengröße im Bereich einer Normalverteilung, dh. keines der Individuen wies einen Trend zu einer zwei- oder mehrgipfeligen Größenverteilung auf. Da es nun aber zu keiner Auftrennung der Erythrozyten in Größenklassen innerhalb eines Tieres kam, dürften die Stammzellen der roten Blutkörperchen, die ja somatischen Ursprungs sind, bei den vorliegenden Tieren einen einheitlichen Genotypus besitzen. Die Histogramme der Flächenverteilung in Abb. 11 zeigen jedoch eine Überlappung der diploiden und der triploiden Taxa. Es wäre somit denkbar, daß große bzw. kleine Erythrozyten, wenn sie nur in sehr geringem Ausmaß produziert werden, am Rande der Verteilungskurve "untergehen". Für einen besser abgesicherten Ausschluß von nebeneinander vorkommenden diploiden und triploiden Typen unter den Stammzellen der Erythrozyten innerhalb eines Individuums müßte eine viel größere Anzahl von roten Blutkörperchen vermessen werden.

Zur Frage nach den Grund des Größenunterschiedes der Erythrozyten bei juvenilen und adulten Fröschen wäre es interessant zu untersuchen ob dies mit der unterschiedlichen Herkunft der Stammzellen zusammenhängt. Bei Amphibien und Vögeln kommt die erste Generation von Blutzellen aus dem Dottersack die mit dessen Rückbildung ebenfalls verschwindet. Die nächste, lebenslange Stammzellengeneration bildet sich aus dem mesodermalen Anteil der Aortenwand (Gilbert, 1994).

4.2 Hodenhistologie

Eine frühe, vergleichend-histologische Untersuchung an Wasserfröschen über die Zellformen der Spermatogenese stammt von Levy (1915). Angaben zur Hodenstruktur fehlen darin. Damals wurden die Wasserfrösche unter dem Artnamen *Rana esculenta* zusammengefaßt und als drei Unterarten ("Varietäten") angesehen. Die morphologische Beschreibung der Versuchstiere und die Angabe des Längenverhältnisses von erster Zehe zu Fersenhöcker erlaubt aber die sichere Einordnung in die heutige Taxonomie. Demnach entspricht:

<i>Rana esculenta ridibunda</i>	<i>Rana ridibunda</i>
<i>Rana esculenta typica</i>	<i>Rana kl. esculenta</i>
<i>Rana esculenta lessonae</i>	<i>Rana lessonae</i>

Levy konstatierte eine vollkommene Übereinstimmung der Reifungsvorgänge bei allen drei Formen, gab aber an, Unterschiede in der Größe der Zellen sowie in der Länge und Breite der homologen Mitosespindeln gefunden zu haben. Leider findet man dazu keinerlei Meßdaten in dieser Studie. Er arbeitete, wie er angibt, vorwiegend mit *Rana esculenta typica* wobei das Problem von diploiden und triploiden Tieren damals noch nicht bekannt war. Obwohl Frösche seit vielen Jahren hindurch sehr beliebte Studienobjekte waren, fand ich keine ausführliche,

histologische Studie über den inneren Aufbau der Hoden von Wasserfröschen die man als Vergleichsgrundlage heranziehen könnte.

Bei den Hodenquerschnittsbildern (Abb. 13 bis Abb. 17) beeindruckt der enorme Größenunterschied zwischen *R. ridibunda* und *R. lessonae*. Weiters fällt der triploide *R. kl. esculenta* auf (Abb. 16), der sehr unregelmäßige und zum Teil sehr große Tubulusanschnitte aufwies. Eine Rekonstruktion des Verlaufes der Hodentubuli im Vergleich zu den Ausgangsarten wäre interessant, doch liegt keine einzige Arbeit dazu vor.

Durch die Verwendung zweier Fixierungsmittel (Bouinsches Gemisch und Alkohol-Eisessig) kam es zu unterschiedlichen Schrumpfung des Hodens. Die absoluten Werte der Tubulusanschnittsflächen wurden darum auf die Summe aller Anschnittsflächen bezogen und in Prozent ausgedrückt. Dies ändert grundsätzlich nichts an der Verteilungsform, kann aber beim Vergleich der Taxa zu einem Irrtum führen. In der Abb. 23 ist über dem Graphen für die absoluten Tubulusanschnittsflächen auch der Verlauf dieser relativen Tubulusanschnittsflächen dargestellt. Die hierbei auftretenden Unterschiede zwischen den Taxa sind allerdings zum größten Teil durch deren unterschiedliche mittlere Hodenquerschnittsfläche bedingt da wie bereits erwähnt die mittlere absolute Tubulusanschnittsfläche in etwa gleich bleibt.

Bei allen Querschnitten überwiegen relativ kleine Tubulusanschnittsflächen, obwohl, optisch, bei manchen die großen scheinbar dominieren. Klar ersichtlich ist das aus dem zu jedem Schnittbild erstellten Verteilungsdiagramm (Abb. 13 bis 17), das in allen Fällen eine ausgeprägte linkssteile Verteilung zeigt. Für so eine Verteilungsform ist es besser als Lagemaß des Mittels den Medianwert anzugeben. Für alle untersuchten Taxa lag nun die mittlere Tubulusanschnittsfläche bei rund $0,030 \text{ mm}^2$. Es gibt hierin keinen auffallenden Unterschied zwischen den Taxa.

Die Anzahl der Rete testes- und Tubulusanschnitte steigt mit zunehmender Hodenquerschnittsfläche (Abb. 21 und Abb. 22). Dieser Zusammenhang gilt für alle untersuchten Taxa. Diploide *R. kl. esculenta* zeigen hier also keine intermediäre Stellung wie es bei anderen morphologischen Merkmalen typisch ist.

Einige neuere Befunde zur Hodenhistologie findet man bei Günther (1973). Bei *R. ridibunda* und *R. lessonae* fand er in allen ausdifferenzierten Hodentubuli eine große Anzahl normal gestalteter Spermien woraus er eine hohe Fertilität dieser Tiere folgerte. Aber selbst der von ihm vorgestellte typische Hodenquerschnitt eines *ridibunda*-Männchens zeigt neben einigen 'normalen' Tubulusanschnitten einen, dessen Situation er später bei einem *esculenta*-Männchen als gestört bezeichnet. Was er unter einem ausdifferenzierten Hodentubulus versteht, geht

leider ebenfalls nicht hervor. Die Präparation der Hoden erfolgte, soweit man den Abbildungstexten entnehmen kann, im Oktober und November, zu einem Zeitpunkt also, da der Spermatogenesezyklus schon weitgehend abgeschlossen ist. Die hier untersuchten Tiere wurden wesentlich früher präpariert und so fanden sich in 1/4 - 1/3 der Tubulusanschnitte keine Spermien.

Für *R.kl.esculenta* gibt Günther eine verhältnismäßig geringe Spermienproduktion als charakteristisch an. Ebenso typisch war aber auch das Auftreten von hochfertilen Tieren und solchen die in ihren Hoden überhaupt keine Spermien enthielten. Weiters gibt er Blockierungen und Unterbrechungen der Spermatogenese an, wobei es allerdings schwierig sein dürfte, aus statischen Hodenquerschnitten auf Störungen im Ablauf eines dynamischen Prozesses zu schließen.

Die von Günther in der selben Arbeit angegebene Dichte der Hodenkanälchen (Tubuli pro mm² Hodenquerschnitt) ist generell etwa um die Hälfte geringer verglichen mit den Werten dieser Untersuchung (Abb. 24). Leider gibt Günther nicht an, auf welche Art und Weise er zu seinen Ergebnissen kam; ein Vergleich der Werte erscheint deshalb problematisch. Weiters führt er an, daß die Hodenkanälchen bei *R.kl.esculenta* im allgemeinen wesentlich größer und überdies sehr unregelmäßig geformt sind. Diese Beschreibung trifft allerdings sehr gut auf die hier untersuchten triploiden Hybriden zu, deren Schnittbild recht eigenartig geformte, große Tubulusanschnitte zeigt (Abb. 16). Günther gibt aber nicht an, ob die von ihm untersuchten *R.kl.esculenta* di- oder triploid waren, obwohl die Existenz von triploiden Teichfröschen schon bekannt war (Günther, 1970).

Aus seinen Kreuzungsexperimenten und den generell relativ kleinen Hoden von *R.kl.esculenta*, verglichen mit seinen Elternarten, lassen sich zwar eindeutig Fertilitätsschwächen ableiten, das dazugehörige histologische Bild ist aber meiner Einschätzung nach keineswegs so klar. Eine detaillierte Untersuchung der histologischen Verhältnisse bei den Ausgangsarten *R.ridibunda* und *R.lessonae* würde die sehr variablen Ergebnisse beim diploiden und triploiden Hybriden wohl verständlicher machen.

In vielen Querschnitten waren Metaphasestadien I der Meiose anzutreffen. Bei geeigneter Lage der Schnittebene war der Spindelapparat gut zu sehen, beide Halbspindeln waren dabei immer ausgebildet. In Anlehnung an die Untersuchungen von Cimino (1972) wurde auch bei Wasserfroschhybriden mit der Ausbildung von nur einer Halbspindel während der Meiose spekuliert, um die Segregation von väterlichem und mütterlichem Chromosomensatz zu erklären. Diese Annahme wurde aber bald fallen gelassen (Günther & Plötner, 1988) und findet auch hier keinerlei Bestätigung. Neuere Untersuchungen (Tunner & Heppich-Tunner, 1991; Ohtani, 1993) zeigten degenerierte Mitosechromosomen in der frühen Vermehrungsphase der Keimzellen. Über den Grund dieser

Chromosomendegeneration und über den Mechanismus der spezifischen Elimination eines Genoms gibt es bis dato nur Vermutungen.

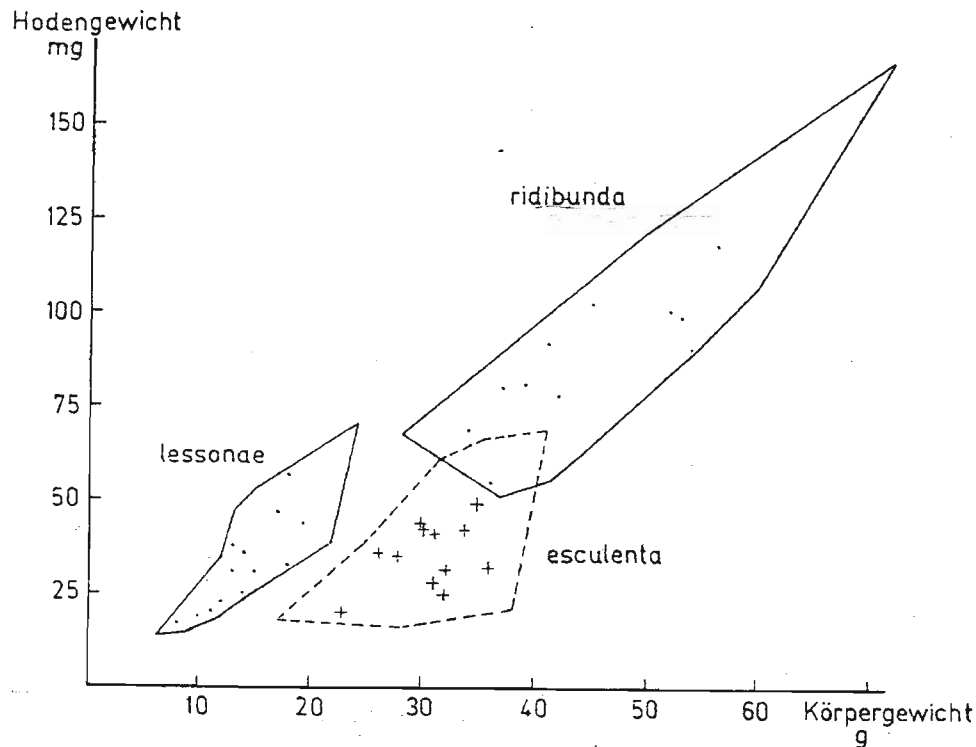
Interessant dazu sind vielleicht folgende Berichte die man in älterer, histologischer Literatur findet. Demnach berichtete Kuschakewitsch (1908, 1910) von der Ausstoßung von Keimzellen aus der Gonadenanlage in die Leibeshöhle bei etwa einem Monat alten Larven von *R. esculenta*. Diesen Vorgang hatte auch schon Bouin (1901) bei 29-30 mm langen Larven von *Rana temporaria* als "ponte d'ovules primordiaux" beschrieben. Witschi (1914) bestätigte bei seiner Untersuchung über die experimentelle Entwicklungsgeschichte der Keimdrüsen von *R. temporaria* den Ausstoß von Keimzellen. Allerdings nur bei Weibchen die unter abnormalen Temperaturbedingungen aufwuchsen. Er schreibt:

"Soweit das zu beurteilen war, wurden aber ausschliesslich Zellen, welche bereits die Anzeichen der Degeneration zeigten, in die Leibeshöhle hinausbefördert und zur gleichen Zeit wurden zahlreiche andere Oozyten im Inneren der Keimdrüse selbst aufgelöst. Es scheint mir also ... dass die Ausstossung von Keimzellen als eine Depressionserscheinung aufzufassen ist, die aber mit dem normalen Entwicklungsgang der Keimdrüsen nichts zu tun hat".

In der eingesehen Wasserfroschliteratur findet sich kein weiterer Hinweis auf die bemerkenswerte Beobachtung von Kuschakewitsch. Es wäre interessant diesem Hinweis im Lichte der neuen Erkenntnisse nachzugehen.

4.3 Hodenquerschnittsfläche und Kopf-Rumpf Länge

Abb. 19 zeigt wie überraschend linear (Bestimmtheitsmaß $R^2=0,998$ nach Pearson) die mittlere Hodenquerschnittsfläche mit der mittleren Kopf-Rumpf Länge der Taxa ansteigt. Die einzige Ausnahme bildete hier der diploide Hybrid *R.kl.esculenta*, der im Verhältnis zu seiner Körperlänge eine recht kleine Hodenquerschnittsfläche besitzt. Er liegt somit deutlich unterhalb der errechneten Regressionsgeraden. Hierzu muß man kritisch bemerken, daß zum Zeitpunkt der histologischen Untersuchungen nur ein einziges Exemplar des diploiden Hybriden zur Verfügung stand. Relativ kleine Hoden im Vergleich zur Körpergröße scheinen aber bei diesen Tieren die Regel zu sein (Tunner, pers.), wie auch eine Untersuchung von Günther (1973) zeigte. Er stellte in dieser Arbeit das Hodengewicht von Wasserfröschen ihrem Körpergewicht gegenüber. *R. lessonae* und *R. ridibunda* hatten in etwa das gleiche Verhältnis von 2,15 bzw. 1,93 mg Hodengewicht je Gramm Körpergewicht). Demgegenüber besitzt *R.kl.esculenta* nur etwa halb so schwere Hoden (1,16 mg Hodengewicht je Gramm Körpergewicht). Verbindet man, wie in der nachfolgenden Abbildung gezeigt, die Mittelwerte der beiden Ausgangsarten in der von Günther erstellten Graphik so liegt der diploide Hybrid *R.kl.esculenta* ebenfalls deutlich unterhalb dieser Linie.



Form	n	mittl. Körpergewicht (g)	mittl. Hodengewicht (mg)	Hodengewicht (mg) pro g Körpergewicht
<i>rid.</i>	18	45	87	1,93
<i>esc.</i>	19	31	36	1,16
<i>less.</i>	21	13	28	2,15

Abb. 33: Das Verhältnis von Hodengewicht zu Körpergewicht bei Wasserfröschen. *R. lessonae* und *R. ridibunda* weisen in etwa die gleiche Relation von Hodengewicht zu Körpergewicht auf. Der Hybrid besitzt im Vergleich zu seinem Körpergewicht nur etwa 1/2 so schwere Hoden wie seine Ausgangsarten. Verbindet man die Mittelwerte der Eltern so liegt der diploide Hybrid deutlich unterhalb dieser Linie (Zeichnung und Tabelle nach Günther, 1973; Zeichnung ergänzt).

Der aus den histologischen Daten abgeleitete Index, gebildet aus dem Verhältnis von mittlerem äquivalentem Hodenradius r_e (errechnet aus der Hodenquerschnittsfläche) zur mittleren Kopf-Rumpf Länge führt zu einem ähnlichen Ergebnis wie die nachfolgende Tabelle (in Anlehnung an Günther, 1973) zeigt.

Abb. 34: Das Verhältnis von mittlerem äquivalentem Hodenradius r_e (errechnet aus der Hodenquerschnittsfläche) zur mittleren Kopf-Rumpf Länge. Der diploide Hybrid *R.kl.esculenta* besitzt im Vergleich zu seiner Körperlänge deutlich kleinere Hoden wie seine Ausgangsarten. Die Triploiden hingegen weisen ähnliche Körperrelationen wie *R.ridibunda* auf.

Form	n	mittl. äquiv. Hodenradius [μ m]	mittl. Kopf-Rumpf Länge [mm]	Hodenradius [μ m] pro mm Körperlänge
<i>rid.</i> (RR)	4	1530	72,8	21,0
<i>esc.</i> (LR)	1	986	69,2	14,2
<i>less.</i> (LL)	4	707	39,8	17,8
<i>esc.</i> (LLR)	4	1308	61,7	21,2
<i>less.</i> (LLL)	3	1149	53,3	21,6

In beiden Fällen ist also die Hodengröße des diploiden Hybriden *R.kl.esculenta* im Vergleich zu seiner Körpergröße deutlich kleiner als bei seinen Ausgangsarten. Die folgende Tabelle gibt einen Vergleich, ausgedrückt in Prozent, der vorliegenden Werte und der Ergebnisse von Günther (1973).

Abb. 35: Vergleich der Hodengrößenverhältnisse von diploiden *R.kl.esculenta* (LR) zu seinen Ausgangsarten *R.lessonae* und *R.ridibunda* und zum triploiden Hybriden. Die für Günther (1973) angegebenen Zahlen basieren auf dem Verhältnis von mittlerem Hodengewicht zu mittlerem Körpergewicht. Dem gegenüber sind die eigenen Werte angeführt die auf dem Verhältnis von mittlerem äquivalentem Hodenradius r_e (errechnet aus der Hodenquerschnittsfläche) zur mittleren Kopf-Rumpf Länge der Taxa basieren. Der diploide Hybride *R.kl.esculenta* reicht in keinem Fall an die Hodengröße seiner Ausgangsarten heran.

<i>R.kl.esculenta</i> (LR) erreicht gegenüber:	errechneten Werte für Günther (1973)	eigene Werte aus vorliegender Arbeit
<i>R.lessonae</i> (LL)	54%	80%
<i>R.ridibunda</i> (RR)	60%	68%
<i>R.kl.esculenta</i> (LLR)	k.A.	67%

Während das für Tierhybriden allgemein verbreitete Auftreten von unterentwickelten Hoden auf den diploiden Hybriden zutrifft, besitzt der triploide Hybrid *R.kl.esculenta* (LLR) Gonaden von normaler Größe.

Abb. 36: Vergleich der Hodengrößenverhältnisse von triploiden *R.kl.esculenta* (LLR) zu seinen Ausgangsarten *R.lessonae* und *R.ridibunda* und zum diploiden Hybriden. Bei Günther (1973) finden sich keine Angaben für triploide Tiere. Die angeführten Werte basieren auf dem Verhältnis von mittlerem äquivalentem Hodenradius r_e (errechnet aus der Hodenquerschnittsfläche) zur mittleren Kopf-Rumpf Länge der Taxa. Der triploide Hybride *R.kl.esculenta* erreicht in beiden Fällen die Hodengröße seiner Ausgangsarten.

<i>R.kl.esculenta</i> (LLR) erreicht gegenüber:	Werte aus vorliegender Arbeit
<i>R.lessonae</i> (LL)	119%
<i>R.ridibunda</i> (RR)	101%
<i>R.kl.esculenta</i> (LR)	149%

Ähnlich liegen die Verhältnisse beim triploiden Kleinen Wasserfrosch aus künstlichen Kreuzungen.

Abb. 37: Vergleich der Hodengrößenverhältnisse von triploiden *R.lessonae* (LLL) gegenüber den anderen Taxa. Er übertrifft die diploiden *R.lessonae* und liegt gleichauf mit *R.ridibunda* und triploiden Hybriden *R.kl.esculenta* (LLR).

<i>R.lessonae</i> (LLL) erreicht gegenüber:	Werte aus vorliegender Arbeit
<i>R.lessonae</i> (LL)	121%
<i>R.ridibunda</i> (RR)	103%
<i>R.kl.esculenta</i> (LR)	152%
<i>R.kl.esculenta</i> (LLR)	102%

Folgende Tatsache könnte dafür verantwortlich sein: Beide, diploide und triploide Hybriden, erhalten früh in der Ontogenese durch Elimination eines kompletten Elternchromosomensatzes aus der Keimbahn (LR eliminiert L oder R und verdoppelt den verbleibenden Chromosomensatz, LLR eliminiert R) nicht mischerbige Urkeimzellen. Der Grund für die unterschiedliche Hodengröße sollte demnach nicht in den Keimzellen selbst liegen. Vielmehr könnte man dafür die Hodenzellen somatischen Ursprungs verantwortlich machen, in die das Keimgewebe eingebettet ist. Diese somatischen Zellen bauen die Follikel, die Tubuluswände, das Rete testis und das Zwischengewebe auf, bestimmen somit sehr stark die Struktur der Gonade und haben durch die Produktion von Testosteron in den interstitiellen Zellen direkten Einfluß auf die Spermatogenese. Diese somatischen Zellen tragen nun, im Gegensatz zu den Keimzellen, weiterhin das hybride Genom. Besitzen sie die genetische Konstitution LR kann sich der Hoden nicht normal groß entwickeln. Liegt wie bei den genetischen Typen LLR und LLL ein doppelter *lessonae*-Genomsatz vor, erreicht der Hoden normale Größe.

4.4 Die Häufigkeit der Spermatogenesestadien

Die Profile aller untersuchten Taxa (Abb. 25) gleichen sich weitgehend und zeigen durch das häufiges Auftreten von primären Spermatogonien (SPG I), sekundären Spermatogonien (SPG II) und primären Spermatocyten (SPC I), daß der Spermatogenesezyklus bereits gestartet wurde und bei allen histologisch untersuchten Tieren auch zeitlich etwa gleich weit vorangeschritten war. Nach Minucci et al. (1992) ist die Abgabe der Spermien ein wichtiges Signal zur Initiation der Spermatogenesewelle. Demnach sollten alle Frösche bereits vor dem Sammeldatum abgelaicht haben. Die Anzahl der Tubulusanschnitte die noch viele Spermienbündel enthielten ist dementsprechend gering und in 1/3 bis 1/4 der Samenkanälchen fanden sich überhaupt keine Spermien mehr. Eine Ausnahme ist der untersuchte diploide Hybrid *R.kl.esculenta* (Nr. 1059) der jedoch als einziger bereits im März aufgesammelt wurde.

Die beiden Hybridtaxa (LR, LLR) und der triploide *R.lessonae* (LLL) haben gegenüber den beiden "guten Arten" einen etwas flacheren Verlauf des Häufigkeitsprofiles, dh. Spermatogonien und Spermatozyten wurden weniger oft in den Tubulusanschnitten gefunden. Die Spermatogenese scheint bei diesen Tieren ähnlich, aber in geringerem Umfang abzulaufen.

4.5 Die Größe der Spermien

St.George von la Valette (1886), der sich vor mehr als 100 Jahren sehr intensiv mit der Spermatogenese im Tierreich beschäftigte, gab für Spermienköpfe von *R.esculenta* eine Länge von 15-21µm bei einer Dicke von 2-3µm an. Aufgrund der oftmaligen Umstellung der Wasserfroschtaxonomie (Günther, 1973) ist es aber fraglich ob die von Valette untersuchten Frösche mit *R.kl.esculenta* im heutigen Sinne identisch sind. In der Arbeit von la Valette fehlt leider eine genaue morphologische Beschreibung der Tiere und somit jeder Anhaltspunkt. Für die mikroskopischen Untersuchungen verwendete er Gentianaserum (?), dessen Zusammensetzung nicht angegeben wurde. Es ist nicht bekannt, ob es sich quellend oder schrumpfend auf Spermien auswirkt.

Die Angabe des Trivialnamens "Grüner Wasserfrosch", der nach Günther (1990) ausschließlich für *R.esculenta* verwendet wurde, die angeführte Hodengröße von durchschnittlich 5 zu 4 mm (maximal 7 zu 5 mm) und die bereits erwähnte Länge und Dicke der Spermien läßt jedoch vermuten, daß la Valette triploide Teichfrösche untersucht hatte. Bei *Bufo cinereus* (syn. für *Bufo bufo*), *Hyla arborea* und *R.esculenta* beschreibt er auch das Auftreten von Riesenspermien. Über letzteren schreibt er:

"Auch bei Rana esculenta stiess ich wieder und zwar recht häufig auf sehr grosse Samenkörper, deren Köpfe bis 0,031mm lang und 0,003 mm dick waren, fand auch die offenbar dazu gehörigen Formen von Spermatiden in ihren aufeinanderfolgenden Entwicklungsstadien auf und habe sie wiederzugeben versucht. Jedoch liessen sich auch Spermatiden und Samenkörper nachweisen, welche zwischen beiden Extremen die Mitte hielten."

Das Auftreten von Riesenspermien dieser Dimension und von intermediär großen Spermien (aneuploid?) sind weitere Hinweise auf das Vorliegen triploider Teichfrösche bei la Valette. Über deren Herkunft und Bedeutung war man sich damals nicht klar, wie folgender Satz zeigt:

"Es scheint demnach diese bisher noch nicht beobachtete, auffallende Erscheinung der so sehr abweichenden Grössendifferenz der Spermiosomen unter den Anuren sehr verbreitet zu sein; ob sie jedoch irgend eine physiologische Bedeutung besitzt, lasse ich dahingestellt und möchte es eher bezweifeln als bejahen."

Auf die unterschiedliche Größe von Eiern bei Teichfröschen wies bereits Berger (1967) hin. Günther (1970) fand bei diploiden und triploiden Teichfroschweibchen ebenfalls mehrere Eigrößen und bei Männchen fiel ihm die hohe Zahl abnormal großer Spermien auf. Als Ursache vermutete er einen erhöhten Chromosomensatz. Inzwischen gibt es mehrere Untersuchungen zur Eigröße bei Wasserfröschen (Berger & Uzzell, 1980; Eikhorst 1984, 1987) und deren Ploidiegrad (Uzzell et al., 1975; Berger et al., 1978a, 1978b; Berger & Roguski, 1978; Berger, 1979; Günther, 1975a). Die kleinen und mittelgroßen Eier von *R.kl.esculenta* sind demnach in der Regel haploid und die großen diploid. Die beiden anderen Wasserfrösche *R.ridibunda* und *R.lessonae* produzieren haploide Eier von nur einer Größenklasse. Über die unterschiedliche Größe von Spermien, und deren Ploidiestufe liegen keine detaillierten Untersuchungen vor, jedoch ist auch hier ein Zusammenhang zwischen der Größe der Spermien und Umfang des Chromosomensatzes anzunehmen. Angaben dazu findet man bei Polls Pelaz (1994), der in einer französischen Teichfroschpopulation bei diploiden Tieren (LR) neben haploiden Spermien 'double-sized spermatozoa' fand, denen er aufgrund seiner mikrodensidometrischen Messungen den doppelten Chromosomengehalt zuordnete. In dieser Population produzieren triploide Tiere (LLR) demnach ausschließlich diploide, große Spermien mit doppeltem *lessonae*-Chromosomensatz. Bei Untersuchungen zur Meiose von Wasserfröschen fand Günther (1975b) bei allen Formen auch aneuploide und polyploide Spermatogonienmitosen im Ausmaß von 3-10%. Wenn deren Teilungsprodukte in die Spermiogenese eintreten, sind auch abweichend große Spermien zu erwarten.

Ein Grund für die spärliche Literatur zum Thema Spermiengröße dürfte wohl in der Kleinheit der männlichen Teichfroschgameten zu suchen sein. 'Stäbchen' in der Dimension von 10 x 2 µm sind selbst bei höchster mikroskopischer

Vergrößerung nur mühsam zu vermessen, viele Spermien weisen darüber hinaus eine leichte bis starke Krümmung auf die die übliche Vermessung mit dem Okularmikrometer unmöglich macht. Das verwendete computerunterstützte Meßsystem ermöglichte eine 10.000x Vergrößerung und die genaue, halbautomatische Vermessung der Länge und des Durchmessers von auch gekrümmten Spermien. Als Größenmaß eignete sich das errechnete Spermienvolumen besser da innerhalb einer untersuchten Probe kürzere Spermien oft etwas dicker waren oder schlankere etwas länger, damit aber ein sehr ähnliches Volumen besaßen. Große Spermien waren sowohl in der Länge als auch im Durchmesser stärker, wodurch die Angabe des Volumens als Vergleichsgröße diese beiden Gruppen noch stärker kontrastierte.

Unter den 10 untersuchten *R. lessonae* gab es nur ein Tier (Nr. 1541) bei dem größere Spermien gefunden wurden. Von diesem Individuum liegen keine elektrophoretischen Untersuchungsergebnisse vor. Es könnte sein, daß dieser Kleine Wasserfrosch nicht komplett "reinerbig" war (Tunner, pers.). Alle *R. ridibunda* produzierten hingegen regelmäßig neben normalen Gameten auch solche von etwa doppeltem Volumen wie aus dem Histogramm in Abb. 29 ersichtlich. Die Gametogenese dürfte damit bei *R. lessonae* im Vergleich zu den anderen untersuchten Wasserfröschen am stabilsten sein. Ein Grund dafür könnte die geringere Introgressionsrate von genetischer *ridibunda*-Information in den *lessonae*-Genpool sein, während es umgekehrt für *lessonae*-Gene schwerer ist einen Weg in den *ridibunda*-Genpool zu finden. Der *lessonae*-Gensatz wird vom Hybriden bei der Rückkreuzung mit den Eltern zwar angenommen und eventuell im geringen Ausmaß mit dem *ridibunda*-Genom rekombiniert, aber zumeist früh aus der Keimbahn eliminiert. Das heißt, das *lessonae*-Genom, welches durch Rekombination mit *ridibunda*-Genen beladenen ist, wird in der Regel aus dem Genpool entfernt. Bei jeder Rückkreuzung wird es von Seiten des *lessonae*-Partners neu eingebracht.

In den Hoden der diploiden Hybriden *R. kl. esculenta* fanden sich überwiegend kleine Spermien, die in der Größenverteilung mit den haploiden *ridibunda*-Gameten nahezu übereinstimmten. Die untersuchten Tiere stammen aus einem L-E System in dem *R. kl. esculenta* das *lessonae*-Genom eliminiert, also Gameten produziert, die den *ridibunda*-Chromosomensatz enthalten. Dies dürfte der Grund für die gute Übereinstimmung in der Spermiengröße sein. Daneben produzierten die diploiden Hybriden auch doppelt so große Spermien, verglichen mit *R. ridibunda*, in vermehrtem Ausmaß. Während bei den Teichfroschweibchen etwa 3% der Eier von der normalen Größenklasse abweichen (Günther, 1990), liegt der Prozentsatz von übergroßen männlichen Gameten nach eigenen Einschätzungen bei mindestens 10%. Genaue quantitative Untersuchungen zu diesem Thema wurden nicht durchgeführt.

Die Hoden der triploiden *R.kl.esculenta* hatten fast ausschließlich Spermien, die ungefähr das doppelte Volumen, verglichen mit den diploiden Taxa, besaßen. Kreuzungsexperimente mit Fröschen dieser Population (Heppich-Tunner & Tunner, 1991) zeigten, daß diese triploiden Teichfrösche LL-Spermien produzierten. Der doppelte Chromosomensatz führte also auch zu einer Verdoppelung des Spermienvolumens. Ähnliche Verhältnisse beschrieb Polls Pelaz (1994) für triploide Teichfrösche einer französischen Population. Die triploiden Tiere besitzen dort ebenfalls nur männliches Geschlecht und geben diploide Spermien ab, die den doppelten *lessonae*-Chromosomensatz besitzen. Allerdings stammen die hier untersuchten Tiere aus einem R-E System, in dem diese männlichen, triploiden Teichfrösche mit *R.ridibunda* beiderlei Geschlechts zusammen auftreten. Polls Pelaz arbeitete hingegen an einer L-E Froschpopulation, in der, neben *R.lessonae*, diploide Teichfrösche beiderlei Geschlechts und triploide männliche Teichfrösche zu finden waren. Die große Streuung des Spermienvolumens einerseits, und dessen glockenförmige Verteilung andererseits (Histogramm in Abb. 29) läßt vermuten, daß neben den diploiden Gameten auch haploide, triploide und aneuploide erzeugt wurden. Polls Pelaz (1994) erwähnt hingegen bei seinen Untersuchungen nur das gelegentliche Auftreten von tetraploiden Spermien bei triploiden Teichfröschen.

Eine völlig abweichende Verteilungsform des Spermienvolumens sieht man im Histogramm (Abb. 29) für triploide *R.lessonae*. Bei der gewählten Klassenaufteilung gruppierten sich die Spermien grob in drei Gruppen hinter denen man, in Anlehnung an die Ergebnisse der vorangehend beschriebenen Taxa, den haploiden bis triploiden Chromosomensatz vermuten kann. Die Abgrenzung dieser Gruppen zueinander ist nicht scharf ausgeprägt was wohl auf den hohen Anteil aneuploider Spermien zurückzuführen ist. Polls Pelaz (1991, zitiert aus Polls Pellaz, 1994) untersuchte den einzigen gefundenen, männlichen, triploiden *R.lessonae* der französischen Population bezüglich seiner Spermatogenese. Er schreibt: "...the only male autotriploid LLL frog found in the same population displayed abnormal spermatogenesis characterised by irregular meiosis including simultaneously univalent, bivalent, trivalent and polyvalent chromosomes at the Metaphase I stage. Thus, spermatozoa issued from that LLL seem to be aneuploid and the whole progeny fathered by that male turned out to be lethal". Die Spermatogenese scheint beim triploiden Kleinen Wasserfrosch also sowohl bei natürlich vorkommenden als auch bei Tieren aus künstlicher Kreuzung schwer gestört.

Die vorliegenden Ergebnisse, auch die von Polls Pelaz, beziehen sich auf Spermien die aus gequetschtem oder homogenisiertem Hodengewebe stammen. Es wäre interessant, im Vergleich dazu, die Größenverteilung von Spermien zu untersuchen, wie sie von den Tieren natürlicher Weise abgegeben werden. Dazu könnte man Spermien wie sie häufig in der Kloake laichbereiter Tiere zu finden sind verwenden. Unterschiede in der Größenverteilung von Spermien aus Hodengewebe und Kloake würden auf eine Filterfunktion der samenableitenden Kanäle hinweisen. Auch Unterschiede in der Beweglichkeit der Spermien entlang dieses Weges sollten zu verschiedenen Bildern führen.

5. Zusammenfassung

Die untersuchten Wasserfrösche waren aufgrund ihrer Erythrozytengröße klar in diploide und triploide Tiere zu unterscheiden. Die hier erstmals untersuchten triploiden *R. lessonae* sind in der Größe der roten Blutkörperchen nicht signifikant verschieden von triploiden *R. kl. esculenta*. Es konnten bei keinem Tiere zwei nebeneinander auftretende Größenklassen von Erythrozyten festgestellt werden.

Bei den Hodenquerschnitten fällt der triploide *R. kl. esculenta* durch seine besonders verwundenen und zum Teil sehr großen Tubulusanschnitte auf. Die mittlere Fläche der Tubulusanschnitte ist für alle Taxa in etwa gleich. Die Anzahl der Rete testes- und der Tubulusanschnitte steht in Beziehung zu Hodengröße, unabhängig vom Taxon. Bei geeigneter Lage der Schnittebene war der Spindelapparat gut zu sehen, beide Halbspindel waren dabei immer ausgebildet.

Zwischen mittlerer Hodenquerschnittsfläche und mittlerer Kopf-Rumpf Länge besteht ein linearer Zusammenhang über alle untersuchten Taxa mit Ausnahme des diploiden Hybriden *R. kl. esculenta*. Seine Hodengröße lag im Vergleich zur Körperlänge in allen Fällen deutlich unter dem Wert seiner Ausgangsarten.

Die Spermien ließen sich grob in drei Größenklassen einteilen denen man haploiden, diploiden und triploiden Chromosomensatz zuordnen kann. *R. lessonae* produzierte fast ausschließlich kleine Spermien während *R. ridibunda* und diploide *R. kl. esculenta* neben diesen kleinen auch noch eine beachtliche Anzahl etwa doppelt so großer aufwiesen. Die Größenverteilung des Spermienvolumens war bei *R. ridibunda* und bei diploiden *R. kl. esculenta* nahezu identisch, ein Hinweis auf gleiche Gameten. Triploide *R. kl. esculenta* produzierten hauptsächlich Spermien von doppelter Größe die einen diploiden *lessonae*-Gensatz enthalten. Triploide *R. lessonae* hatten Spermien aller drei Größenklassen ohne scharfe Abgrenzung zueinander. Dies weist auf eine Vielzahl aneuploider Spermien hin.

Literatur

- Berger L. (1967): Embryonal and larval development of F₁-generation of green frogs different combinations.
Acta Zool. (Cracov) **12**(7): 123-160
- Berger L. (1968): Morphology of the F₁-Generation of various crosses within the *Rana esculenta* complex.
Acta Zool. (Cracov) **13**: 301-324
- Berger L. (1979): Egg size as an index of phenotype in progeny of *Rana esculenta* females.
Mitt. Zool. Mus. Berlin **55**(1): 187-202
- Berger L. et al. (1978a): Triploid F₂ Progeny of Water Frogs (*Rana esculenta* complex)
Fol. biol. Krakow **26**(3): 135-152
- Berger L. et al. (1978b): Ploidy of progeny from different egg size classes of *Rana esculenta* L.
Fol. biol. Krakow **26**(4): 231-248
- Berger L. et al. (1986): Diploid eggs of *Rana esculenta* with two *Rana ridibunda* genomes.
Proc. Acad. Nat. Sci. Phila. **138**(1): 1-13
- Berger L. & Ogielska M. (1994): Spontaneous haploid-triploid mosaicism in the progeny of a *Rana* kl. *esculenta* female and *Rana lessonae* males.
Amphibia-Reptilia **15**(2): 143-152
- Berger L. & Roguski H. (1978): Ploidy of progeny from different egg size classes of *Rana esculenta* L.
Fol. biol. Krakow **26**(4): 231-248
- Berger L. & Uzzell T. (1980): The eggs of european water frogs (*Rana esculenta* complex) and their hybrids.
Fol. biol. Krakow **28**(1): 3-25
- Blankenhorn H.J. et al. (1971): Drei Phänotypen von Grünfröschen aus dem *Rana esculenta*-Komplex in der Schweiz.
Rev. Suisse de Zool. **78**: 1242-1247

- Böck P. (1984): Der Semidünnschnitt
J.F. Bergmann Verlag
- Bouin M. (1901): Histogenèse de la glande génitale femelle chez
Rana temporaria.
Arch. de Biol. 17
- Brychta B. (1994): DNA-Gehalt in den Keimzellen männlicher Wasserfrösche:
Durchflußzytometrische Untersuchungen an *Rana ridibunda*, *Rana lessonae* und am Hybrid-Taxon *Rana esculenta* (Anura, Amphibia).
Diplomarbeit an der Universität Wien
- Burck H.C. (1982): Histologische Technik
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
- Cimino L. (1972): Egg-production, polyploidization and evolution in a all-female
fish of the genus *Poeciliopsis*.
Evolution 26: 294-306
- Dubois A. & Günther R. (1982): Klepton and Synklepton: Two new evolutionary
systematic categories in zoology.
Zool. Jb. Syst. 100: 290-305
- Eikhorst R. (1984): Untersuchungen zur Verwandtschaft der Grünfrösche.
Dissertation an der Universität Bremen
- Eikhorst R. (1987): Der Laich des Teichfrosches *Rana esculenta* L. 1758 in einer
reinen Bastardpopulation (Anura: Ranidae).
Salamandra 23(2/3): 122-131
- Engelmann W.E. (1972): Disk-Elektrophorese der Serumproteine von
Wasserfröschen. Ein Beitrag zur Diskussion über den Hybridcharakter von
Rana esculenta L.
Acta. Biol. med. germ. 29: 431-435
- Engelmann W.E. (1973): Zur Frage der verwandtschaftlichen Beziehungen
europäischer Grünfrösche (Gattung *Rana*).
Zool. Jb. 100: 183-196
- Freitag I. (1982): Die Spermatogenese der Wasserfrösche.
Hausarbeit aus Naturgeschichte am Inst. für Zoologie der Univ. Wien

- Gerlach D. (1984): Botanische Mikrotechnik.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
- Gilbert F.S. (ed,1994): Developmental Biology. 4th ed.
Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, USA
- Graf J.D. & Polls-Pelaz M. (1989): Evolutionary genetics of the *Rana esculenta* complex.
In: R.M. Dawley & J.P. Bogart (eds.): Evolution and Ecology of unisexual Vertebrates. Bull. 466. New York State Museum, Albany. N.Y. 289-301
- Günther R. (1970): Der Karyotyp von *Rana ridibunda* Pall. und das vorkommen von Triploidie bei *Rana esculenta* L. (Anura, Amphibia).
Biol. Zbl. **89**: 327-324
- Günther R. (1973): Über die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den europäischen Grünfröschen und den Bastardcharakter von *Rana esculenta* L. (Anura).
Zool. Anz. Leipzig **190** (3/4): 250-285
- Günther R. (1975a): Zum natürlichen Vorkommen und zur Morphologie triploider Teichfrösche, *Rana esculenta* L. in der DDR (Anura, Ranidae).
Mitt. Zool. Mus. Berlin **51**(1): 145-158
- Günther R. (1975b): Untersuchungen der Meiose bei Männchen von *Rana ridibunda* Pall., *Rana lessonae* Cam. und der Bastardform "*Rana esculenta*" L. (Anura).
Biol. Zbl. **94**: 277-294
- Günther R. (1977): Die Erythrozytengröße als Kriterium zur Unterscheidung diploider und triploider Teichfrösche, *Rana esculenta* L. (Anura).
Biol. Zbl. **96**(4): 457-466
- Günther R. (1990): Die Wasserfrösche Europas.
Die Neue Brehm-Bücherei, A.Ziemsen Verlag
- Günther R. & Plötner J. (1988): Zur Problematik der klonalen Vererbung bei *Rana kl. esculenta* (Anura).
Jb. Feldherp. **Beiheft 1**: 23-46
- Günther R. & Senglaub K. (1978): Das Geheimnis der grünen Frösche.
Wiss. Fortschr. **28**: 154-158

- Heppich S. (1978): Hybridogenesis in *Rana esculenta*: C-band karyotypes of *Rana ridibunda*, *Rana lessonae* and *Rana esculenta*.
Z. zool. Syst. Evolut.-forschung 16: 27-39
- Heppich S. (1980): Chromosomenbänder bei Wasserfröschen. Untersuchungen zum Hybridcharakter und zur hybridogenetischen Fortpflanzung von *Rana esculenta* (Anura, Amphibia)
Dissertation am Inst. für Zoologie der Universität Wien
- Heppich S. et.al. (1982): Premeiotic chromosome doubling after genome elimination during spermatogenesis of the species hybrid *Rana esculenta*.
Theor. Appl. Genet. 61: 101-104
- Heppich-Tunner S. & Tunner H. (1991): Spermatogenesis in triploid hybridogenetic frogs (*Rana esculenta*).
Abstract, 3rd Congress of E.S.E.B. 1991, Debrecen, Hungary
- Hertwig G. & Hertwig P. (1920): Triploide Froscharten.
Arch. mikr. Anat. 94: 34-54
- Kuschakewitsch S. (1908): Über den Ursprung der Urgeschlechtszellen bei *Rana esculenta*.
Sitz. Ber. math.-physiol. Kl. Kgl. Bayer. Ak. d. Wiss., 38
- Kuschakewitsch S. (1910): Die Entwicklungsgeschichte der Keimdrüsen von *Rana esculenta*.
Festschr. Richard Hertwig, Band II
- Levy F: (1915): Über die Chromatinverhältnisse in der Spermatozytogenese von *Rana esculenta*.
Arch. mikr. Anat. 86(Abt.II): 85-177, Tafeln III-V
- Linnert G. (Hrsg.,1977): Cytogenetisches Praktikum.
Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New York
- Minucci S. et al. (1992): Intratesticular Control of Spermatogenesis in the frog, *Rana esculenta*.
J. Exp. Zool. 246: 1113-1118
- Nöllert A. & Nöllert C. (1992): Die Amphibien Europas. Bestimmung, Gefährdung, Schutz.
Verlag Franckh-Kosmos, Stuttgart

- Ohtani H. (1993): Mechanism of chromosome elimination in the hybridogenetic spermatogenesis of allotriploid males between Japanese and European water frogs.
Chromosoma **102**: 158-162
- van Oordt P.G.W. (1956): Regulation of the Spermatogenetic Cycle in the Common Frog (*Rana temporaria*).
Doctoral thesis at the University of Utrecht
- Plötner J. & Klinkhardt M. (1992): Investigations on the genetic structure and the morphometry of a pure hybrid population of *Rana* kl. *esculenta* (Anura, Ranidae) in North Germany.
Zool. Anz. **229**(3/4): 163-184
- Polls Pelaz M. (1991): Unisexualité Mâle dans un Peuplement Hybridogénétique de Grenouilles Vertes: Génétique, Éthologie, Évolution.
Thèse de doctorat. MNHN Paris I-XV +1-195
- Polls Pelaz M. (1994): Natural ameiosis in unisexual all-male allotriploids of *Rana* kl. *esculenta*.
Dissertation at the University of Barcelona
- Polls Pelaz M. & Graf J.D.(1988): Erythrocyte size as an indicator of ploidy level in *Rana* kl. *esculenta* before and after metamorphosis.
Alytes (Paris) **7**: 53-61
- Rastogi R.K. et al. (1976): The Control of Spermatogenesis in the Green Frog, *Rana esculenta*.
J. Exp. Zool. **196**: 151-166
- Romeis B. (1989): Mikroskopische Technik
Herausgeber: P. Böck
Verlag Urban & Schwarzenberg
- Roosen-Runge E.C. (1977): The Process of Spermatogenesis in Animals
Cambridge University Press
- Schultz R.J. (1969): Hybridization, Unisexuality and Polyploidy in the Teleost *Poeciliopsis* (Poeciliidae) and other Vertebrates.
Amer. Natur. **103**: 605-619

- Stadelmayer B. (1976): Bau und Funktion der Gonaden bei Anuren unter besonderer Berücksichtigung der Wasserfrösche.
Hausarbeit aus Naturgeschichte am Inst. für Zoologie der Univ. Wien
- Tunner H. (1970): Das Serumeiweißbild einheimischer Wasserfrösche und der Hybridcharakter von *Rana esculenta*.
Verh. Dtsch. Ges. **64**: 352-358
- Tunner H. (1973): Das Albumin und andere Bluteiweiße bei *Rana ridibunda* (Pallas), *Rana lessonae* (Camerano) und deren Hybriden *Rana esculenta* (Linné)
Z. Zool. Syst. Evol. -forsch. **11**: 219-233
- Tunner H. (1974): Die klonale Struktur einer Wasserfroschpopulation
Z. Zool. Syst. Evolut. -forsch. **12**: 309-314
- Tunner H. (1980): Kreuzungsexperimente mit Wasserfröschen aus österreichischen und polnischen Mischpopulationen (*Rana lessonae* und *Rana esculenta*). Eine Analyse biochemischer und morphologischer Merkmale.
Z. Zool. Syst. Evol. -forsch. **18**: 257-297
- Tunner H. & Heppich S. (1981): Premeiotic genome exclusion during oogenesis in the Common Edible Frog *Rana esculenta*.
Naturwissenschaften **68**: 207-208
- Tunner H. & Heppich-Tunner S. (1991a): A new population system of water frogs discovered in Hungary.
Proc. Sixth. Ord. Gen. Meet. S. E. H., Budapest p453-460
- Tunner H. & Heppich-Tunner S. (1991b): Genome exclusion and two strategies of chromosome duplication in Oogenesis of a hybrid frog.
Naturwissenschaften **78**: 32-34
- Tunner H. & Heppich-Tunner S. (1992): Triploid all male offspring from a cross between diploid hybrid frogs
New trends in Genetic
Annual Meeting of the Genetic Society 1992, Tübingen
- Uzzell T. et al. (1975): Diploid and triploid progeny from a diploid female of *Rana esculenta* (Amphibia, Salientia).
Proc. Acad. Nat. Sci. Phila. **127**(11): 81-91

- Uzzell T. & Berger L. (1975): Electrophoretic phenotypes of *Rana ridibunda*, *Rana lessonae* and their hybridogenetic associate *Rana esculenta*.
Proc. Acad. Nat. Sci. Phila. **127**(2): 13-24
- von la Vallete St. George (1876): Über die Genese der Samenkörper. IV. Die Spermatogenese bei den Amphibien.
Arch. mikrosk. Anat. **12**: 797-825
- von la Vallete St. George (1886): Spermatologische Beiträge. Dritte Mittheilung.
Arch. mikrosk. Anat. **27**: 385-397, Tafeln XIV-XVI
- Welzl A. (1994): Verbreitung und Populationsstruktur der Wasserfrösche in den oberen March-Thayaauen zwischen Drösing und Bernhardstal (Niederösterreich, Österreich).
Diplomarbeit an der Universität Wien
- Wickbom T. (1945): Cytological studies on Dipnoi, Urodela, Anura und Emys.
Hereditas (Lund) **31**: 241-346
- Witschi E. (1914): Experimentelle Untersuchung über die Entwicklung der Keimdrüsen von *Rana temporaria*.
Arch. mikr. Anat. **85**(Abt.II): 9-113, Tafeln IV-VIII
- Witschi E. (1924): Die Entwicklung der Keimzellen bei *Rana temporaria*.
Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. **1**: 523-561

Bildanhang

Mit den folgenden Fotografien histologischer Schnitte sollen die beschriebenen Spermatogenesestadien dargestellt werden. Alle Aufnahmen stammen von Hodenquerschnitten von *R. ridibunda*. Die histologischen Verhältnisse entsprechen weitgehend auch denen der anderen Taxa. Die histologischen Charakteristika der spermatogenetischen Stadien sind in der folgenden Tabelle (entnommen aus der Abb. 4) nochmals zusammengefaßt.

Stadium			Generelles Aussehen	Kern u. Nukleoli
a) Vermehrungs- stadium	Primäre Spermatogonien	SPG I	auffallend große Zellen, die an der Wand des Samenkanälchens liegen, von einer oder mehreren Follikelzellen umgeben	unregelmäßig geformter Kern, meist 2 auffallend große Nukleoli vorhanden
	Sekundäre Spermatogonien	SPG II	rundliche Zellen, die bei jedem Teilungsschritt kleiner werden, geringer werdender Cytoplasmaanteil relativ zum Kernanteil, bis zu 8 Zellteilungen dh. mehr als 200 Zellen in einer Cyste am Ende der Vermehrungsphase, Cyste verbleibt an der Tubuluswand	Kern wird streng sphärisch und bei jedem Teilungsschritt geringfügig kleiner
b) Reifungs- stadium	Primäre Spermatozyten	SPC I	vorausgehende Wachstumsphase der Zellen, Cyste dehnt sich zum Tubuluslumen hin aus	Zellkerne werden wieder annähernd so groß wie bei SPG I, verschiedene Stadien der 1. meiotischen Teilung sichtbar, Nucleoli verschwinden
	Sekundäre Spermatozyten	SPC II	deutlich kleinere Zellen, die entlang der Cystenwand konzentriert sind ("Blase" bis "Hohlblase" im Querschnitt)	einzelne Stadien der 2. Reifeteilung kaum sichtbar
c) Spermatiden- stufe	Spermatiden	SPT	kleine, rundliche Zellen an der Cystenwand konzentriert ("Hohlblase" im Querschnitt)	dichter, rundlicher Kern
d) Spermio- genese	Spermien	SP	Hohlblase öffnet sich zum Tubulusvolummen hin, Bündel von Spermien bleiben mit je einer Follikelzelle verbunden	Kern wird stabförmig

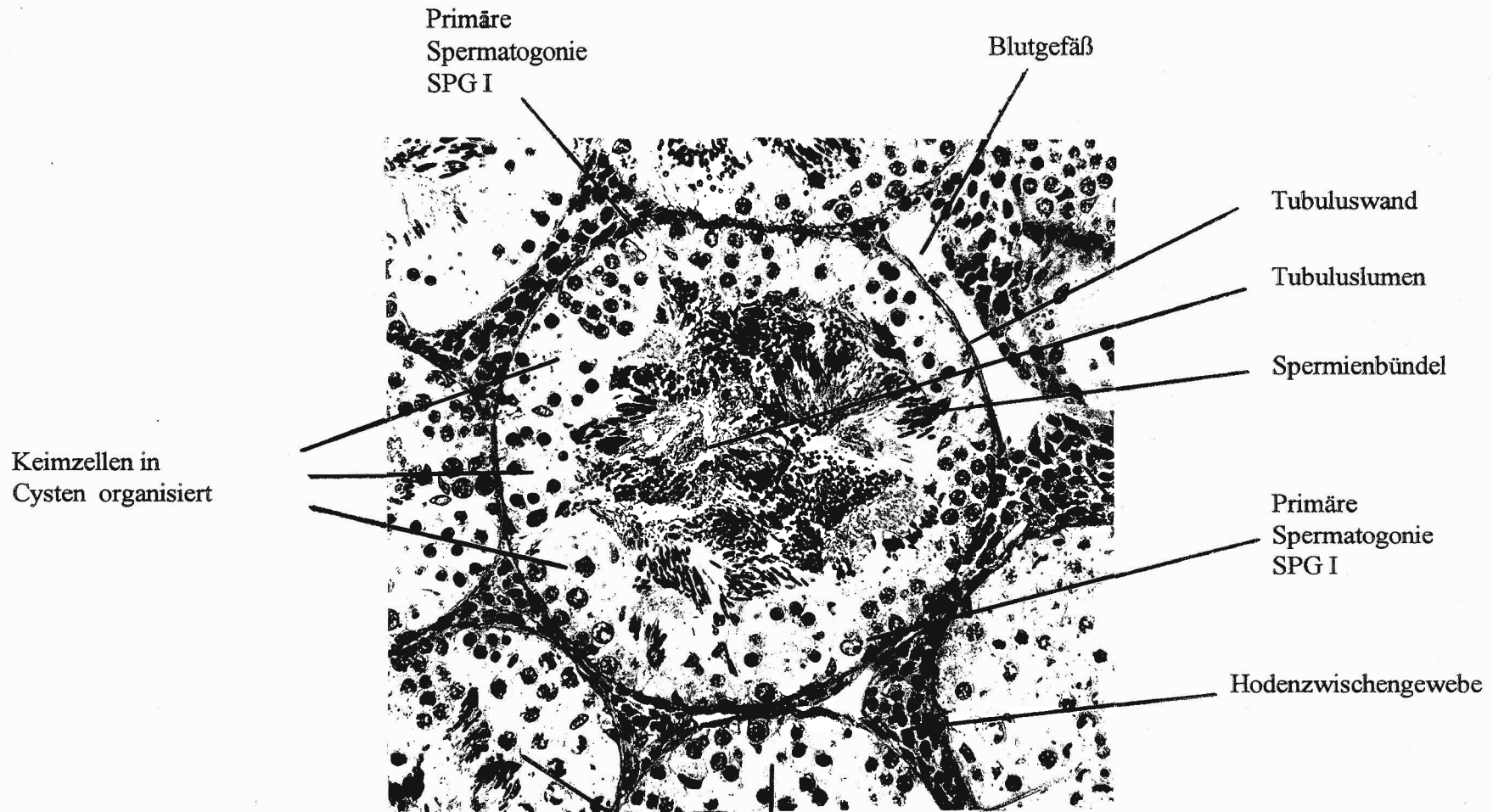


Bild 1: Querschnitt durch Hodentubuli von *R. ridibunda*. Dargestellt ist ein Tubulusquerschnitt, umgeben von sieben weiteren Tubulianschnitten. Im Tubulus sind die Keimzellen in gegeneinander isolierte Cysten organisiert, in denen die Spermatogenese abläuft. Zwischen den Cysten, an der Tubuluswand, liegen Primäre Spermatogonien (SPG I) von denen weitere Keimzellgenerationen abstammen. Das Tubuluslumen ist mit Spermien gefüllt.

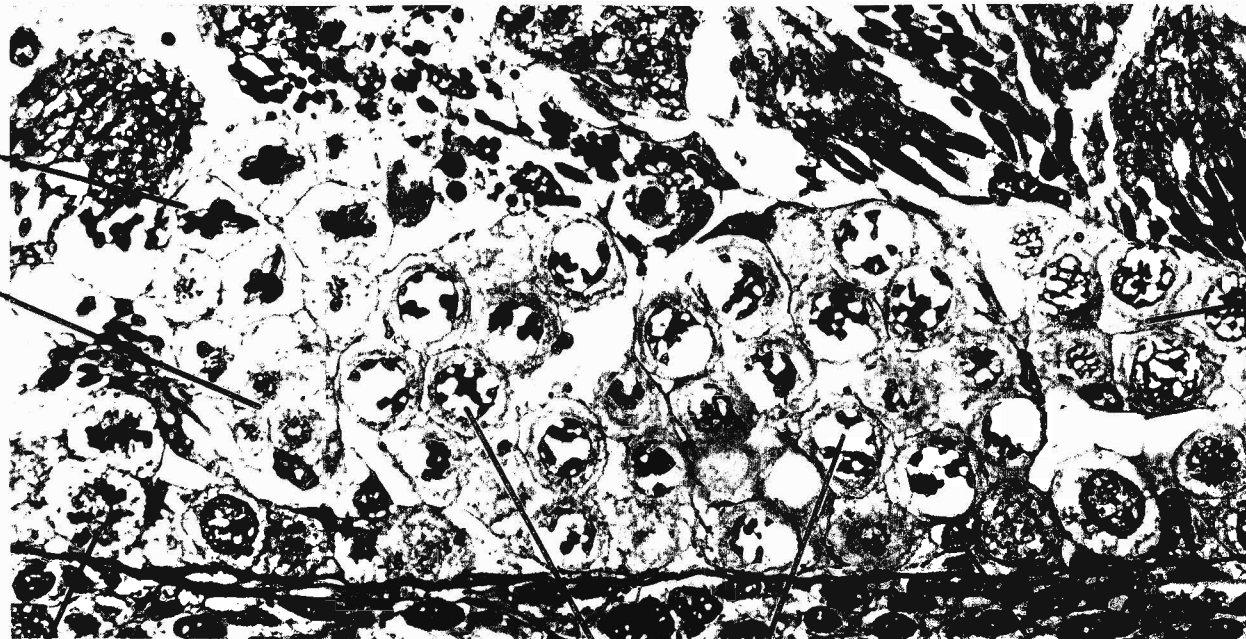
100µm

Cyste mit SPC I
in der Metaphase I
der Meiose

in dieser Cyste
etwas vorausgeeilte
Zellen im Stadium
SPC II

Spermien

Cyste mit SPC I
in der Prophase
(Diplotän) der
Miose



Tubuluswand

Kern einer Cystenzelle

SPG II in der Metaphase
der Mitose
(Vermehrungsstadium)

Cysten mit SPC I in der
Prophase (Diakinese)
der Meiose

Bild 2: Querschnitt durch mehrere Cysten eines Tubulus von *R. ridibunda*. Jede Cyste ist von einer oder mehreren Cystenzellen umhüllt deren Kern peripher liegt und durch seine starke Anfärbung auffällt. Innerhalb einer Cyste sind die Keimzellen im selben Spermatogenesestadium, einzelne Zellen können jedoch vor- oder nacheilen. Verschiedene Cysten weisen Keimzellager in unterschiedlichen Spermatogenesestadien auf: Sekundäre Spermatogonien (SPG II), Primäre Spermatozyten (SPC I), Sekundäre Spermatozyten (SPC II).

30µm

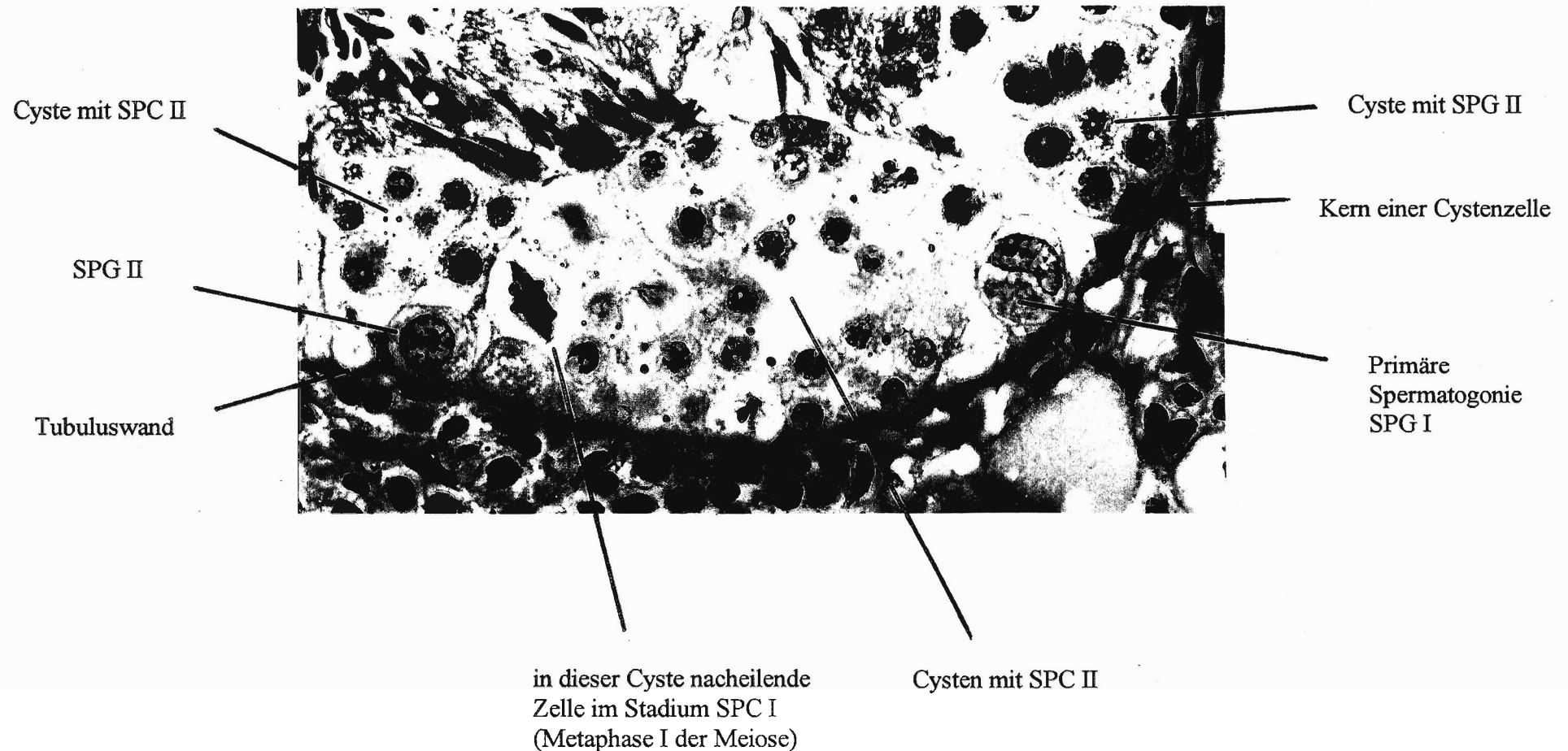


Bild 3: Querschnitt durch mehrere Cysten eines Tubulus von *R. ridibunda*. Die an der Tubuluswand liegende Primäre Spermatogonie (SPG I) zeichnet sich aus durch den unregelmäßig geformten Kern und die auffallende Zellgröße im Vergleich zu den Sekundären Spermatogonien (SPG II). Die zentral dargestellte Cyste enthält Sekundäre Spermatocyten (SPC II) und einige nacheilende Keimzellen die als Primäre Spermatocyten (SPC I) noch in der Metaphase I der Meiose stecken.

30µm

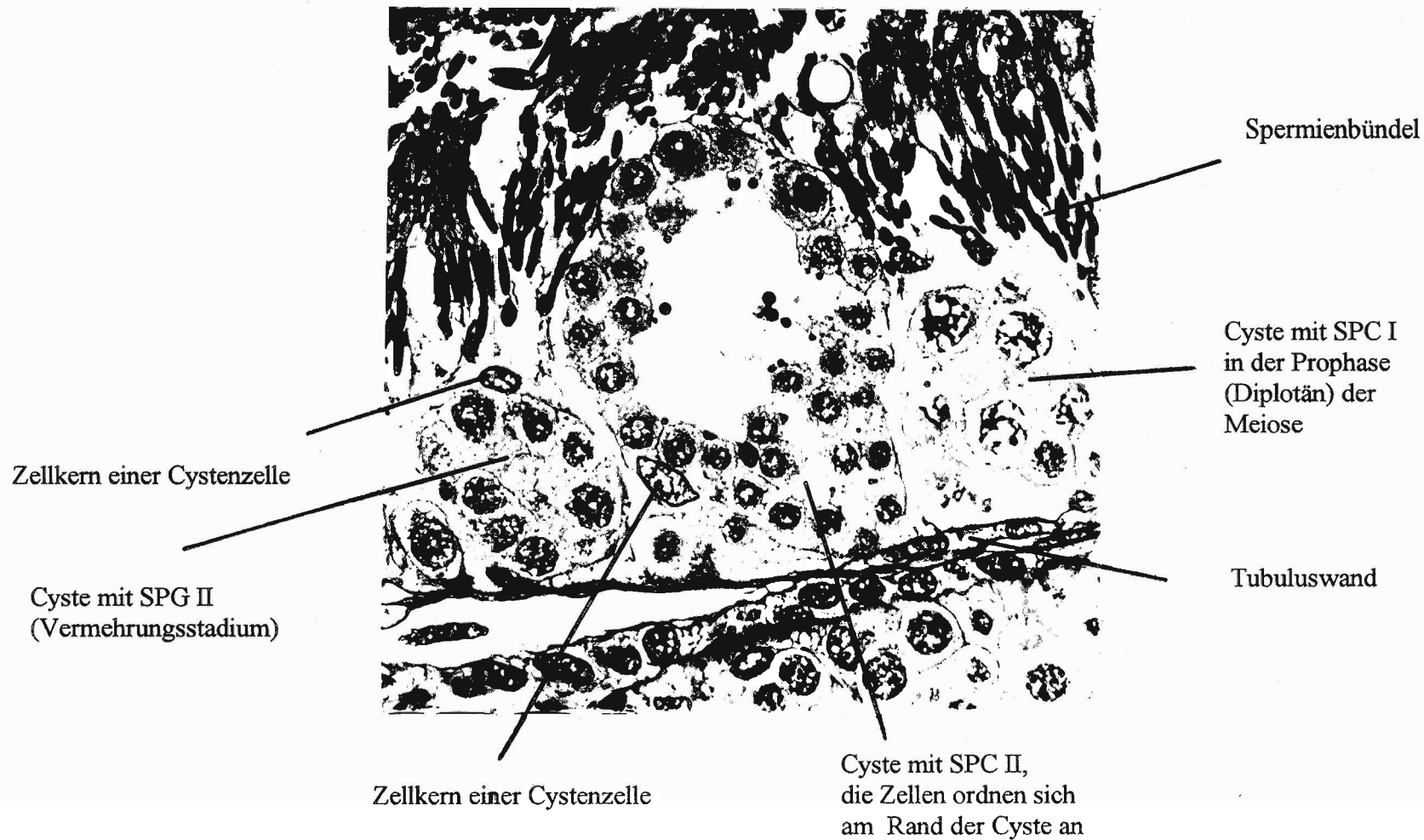
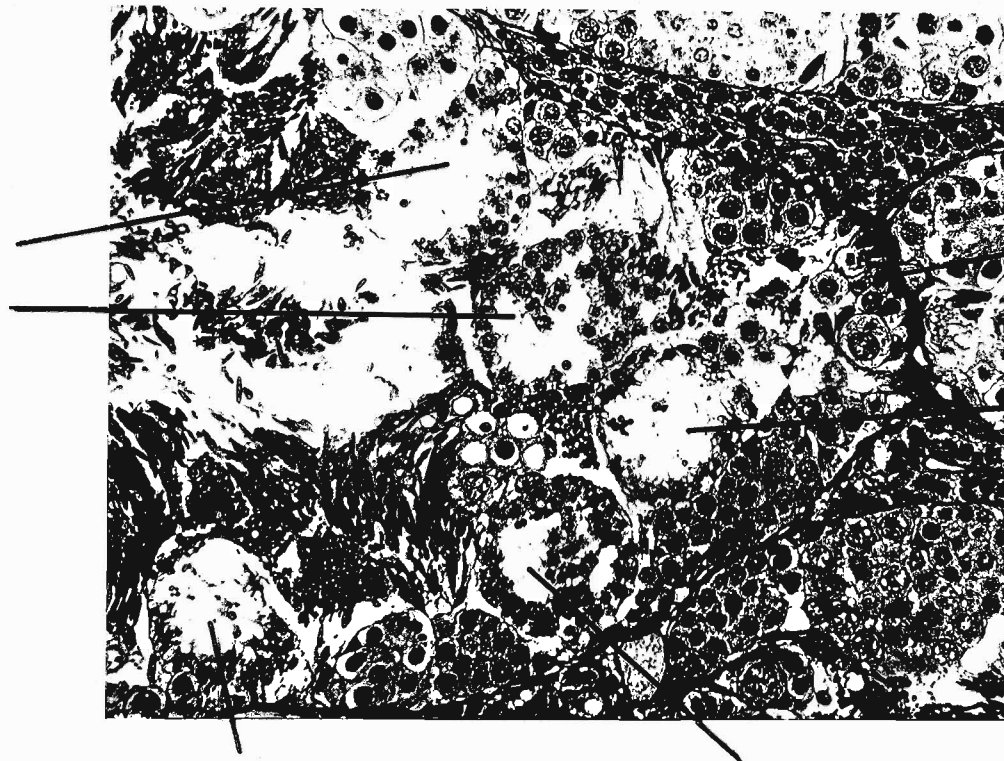


Bild 4: Querschnitt durch drei Cysten eines Tubulus von *R. ridibunda* Primäre Spermatocyten (SPC I, rechte Cyste) weisen gegenüber dem vorhergehenden Stadium (Sekundären Spermatogonien SPG II, linke Cyste) stark angeschwollenen Zellkerne auf. Die Sekundären Spermatocyten (SPC II, mittlere Cyste) ordnen sich am Cystenrand an und bilden so eine "Hohlblase" im Querschnitt.

30µm

Cysten mit SPC II,
die Zellen ordnen sich
am Rand der Cyste an



Tubuluswand

Cyste mit Spermatiden

Cyste mit Spermatiden

Cyste mit SPC II,
die Zellen ordnen sich
am Rand der Cyste an

Bild 5: Querschnitt durch einen Tubulus von *R. ridibunda*. Die Sekundären Spermatocyten (SPC II) ordnen sich an der Wand der Cyste an, die im Querschnitt das Bild einer "Hohlblase" bietet. Die Sekundären Spermatocyten (SPC II) wandeln sich zu ebenfalls randständig angeordneten Spermatiden.

100µm

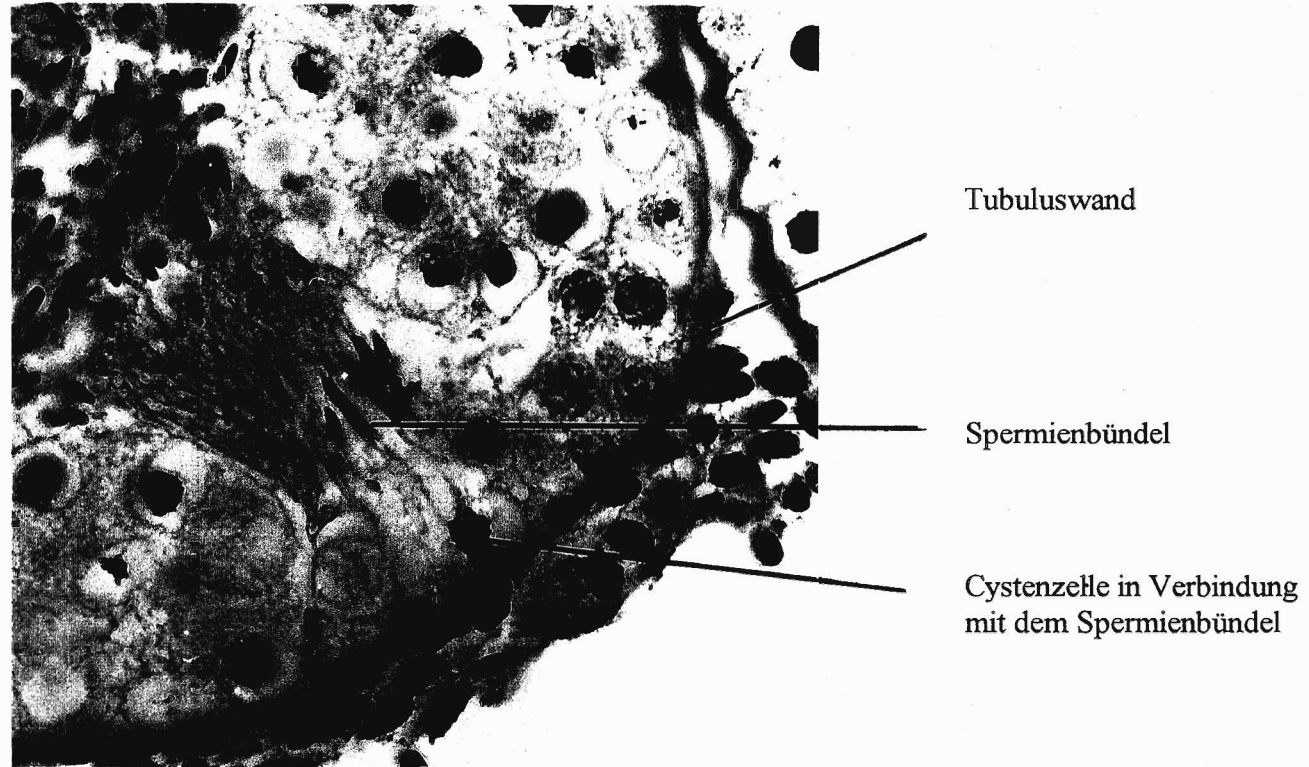


Bild 6: Querschnitt durch einen Tubulus von *R. ridibunda*. Die Cyste zerfällt in Spermienbündel. Diese stehen mit einer, an die Tubuluswand gewanderten Cystenzelle, die nun die Funktion einer Sertolizelle ausübt, in Verbindung.

30µm

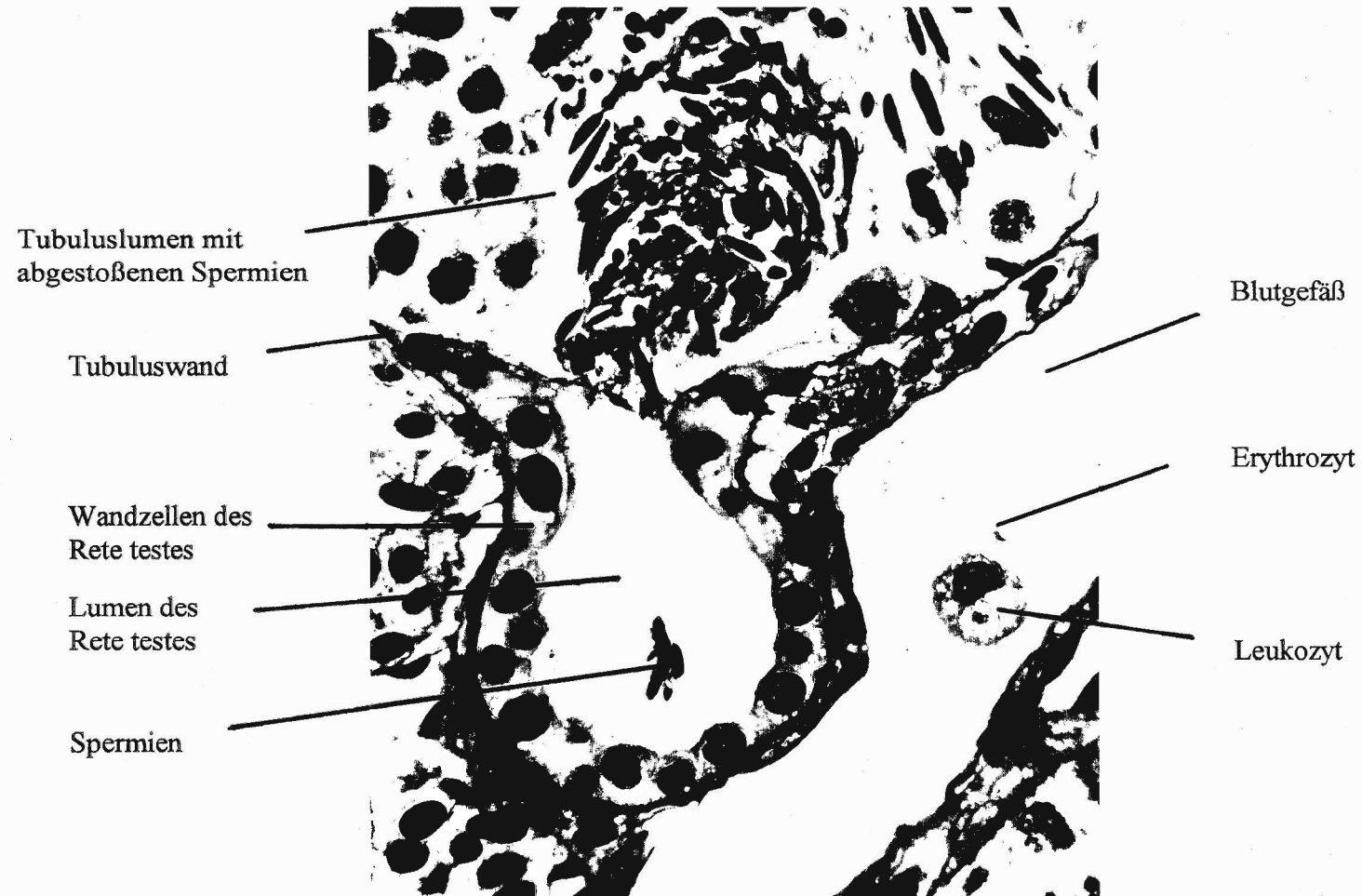


Bild 7: Querschnitt durch einen Tubulus und durch das Rete testes von *R. ridibunda*. Die abgestoßenen Spermien gelangen über eine offene Verbindung vom Tubulus in das Rete testis, das abführende Samenkanälchennetz. Die Wandzellen des Rete testes sind prismatisch und färben sich stark an.

30µm

Lebenslauf

Ich wurde am 25. August 1963 in Oberndorf an der Melk in Niederösterreich geboren. Mein Vater arbeitete als Betriebsschlosser und Werkzeugmacher, zuletzt als Lehrlingsausbildner in einem metallverarbeitenden Betrieb. Meine Mutter führte den Haushalt und betreute mich und drei Geschwister.

Die Volks- und Hauptschule besuchte ich in meinem Heimatort. 1983 erlangte ich die Matura an der Höheren Technischen Lehr- und Versuchsanstalt St. Pölten. Nach Ableistung des Präsenzdienstes begann ich bei der Fa. Telekabel in Wien zu arbeiten. Ich war dort mit der technischen Planung, Instandhaltung und Qualitätssicherung im Wiener Kabelfernsehtznetz befaßt. Nach drei Jahren umfassender Berufspraxis erhielt ich vom Bundesministerium für wirtschaftliche Angelegenheiten die Berechtigung zur Führung der Standesbezeichnung Ingenieur.

Im September 1987 legte ich die notwendige Externistenprüfung für Biologie und Umweltkunde ab und begann im Oktober das Studium der Biologie, Fachrichtung Zoologie, an der Universität Wien. Dabei wurde ich durch ein staatliches Stipendium und 1992 zusätzlich durch ein Leistungsstipendium aus den Mitteln der Stiftungen und Sondervermögen der Universität Wien unterstützt. Das Studienjahr 1993/94 absolvierte ich am King's College in London, gefördert durch das europäische Studentenaustauschprogramm ERASMUS. Mein Studienschwerpunkt lag dort im Fach Ökologie, mit speziellem Interesse an der Meeresökologie.

Nach der Rückkehr begann ich bei Herrn Prof. Tunner meine Diplomarbeit über Wasserfrösche. Nebenbei hatte ich bei Prof. Tunner auch die Gelegenheit an seinen Projekten zur Untersuchung der Froschwanderung im Hansag und über die Analyse der Karyotypen triploider Wasserfrösche mitzuarbeiten.